

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Mecanismos de regulación del receptor de glutamato
tipo NMDA en excitotoxicidad e isquemia cerebral**

TESIS DOCTORAL

Sergio Gascón Jiménez

LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Directora:

DRA. MARGARITA DÍAZ-GUERRA GONZÁLEZ

**Instituto de Investigaciones Biomédicas
CSIC-UAM**

Agradecimientos

Quiero expresar mis agradecimientos a la Dra. Díaz-Guerra, por supuesto, por la financiación de la tesis, pero también por su ayuda, paciencia, apoyo, y por todo el esfuerzo que ha invertido en mí durante todos estos años.

A la Dras. Ángeles Rodríguez Peña, primero por acogernos *huérfanos*, y luego porque nos ofreció todo lo que estuvo en su mano para que tuviéramos la oportunidad de seguir adelante. Al Dr. Jaime Renart, por su aportación científica y económica, sobre todo, en los primeros años de esta tesis.

A la Dra. Teresa Iglesias, y a todos los que han formado o forman parte de los laboratorios 2.7 y 2.4.2: Oscar, Eva, Lucía, Roberto, Noemí, Celia, Alonso, Laura, Laurita y Érika. Por su aportación de ideas y consejos, que son tan importantes en nuestra profesión. Y en este caso quiero mostrar un agradecimiento especial, a Rubén y a Mónica, cuya ayuda, ha aportado una parte imprescindible del proyecto científico de esta tesis.

A los Doctores Francisco Gómez Scholl y Peter Scheifelle, porque han permitido ampliar mi visión de la ciencia, y me han aportado herramientas y soluciones de valor incalculable. Gracias también, en general, a todos los miembros del laboratorio de Peter Scheifelle, en la universidad de Columbia, y a la pequeña y entrañable comunidad de españoles, que me acogieron con cariño y amistad durante los 5 meses de estancia que pasé en New York en los que me hicieron sentir “como en casa”.

Y muy especialmente, agradezco a aquellos que, durante todos estos años, han hecho de mi vida un lugar feliz. Os doy gracias a todos por vuestro apoyo incondicional, cariño, amistad y por los buenos ratos que hemos pasado juntos, fuera o dentro de las paredes del centro. Sin vosotros esto no habría sido posible: Alicia, Irene y su hermana Elena, Lorena, Jesús, Ester, Víctor, Josué, Óscar, Róber, María, Jorge, Javi, Rubén, Elena, Mónica S., Mari, Pepa, Loli y Paloma, entre otros, y por supuesto, mis hermanos y familia, especialmente mis Padres y mi tía Celia, que me lo han dado todo. Gracias. Ahora, cuando miro hacia atrás, me doy cuenta de lo fácil que ha sido andar el camino, con lo difícil que me parecía cuando lo empecé. Siempre tendréis un hueco reservado en aquella parte de mi cerebro que cumple “las funciones del corazón”.

Resumen

Los receptores de glutamato tipo NMDA (NMDARs) son canales iónicos altamente permeables al calcio que tienen una gran relevancia en el funcionamiento normal y patológico del SNC. En accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas, la muerte neuronal secundaria producida se debe, en gran medida, a procesos de excitotoxicidad iniciados por estimulación excesiva de estos receptores. En esta tesis se han caracterizado, utilizando un modelo animal de isquemia cerebral transitoria y cultivos primarios neuronales sometidos a excitotoxicidad, mecanismos de regulación rápida, eficiente e irreversible del NMDAR iniciados por su activación excesiva. Éstos afectan por vías diferentes a sus subunidades NR1 y NR2A, ambas necesarias para la función sináptica y la supervivencia neuronal. Por una parte, hemos demostrado la inhibición transcripcional del gen codificante de NR1 y, por otra, el procesamiento extensivo de las subunidades NR2A por calpaína, una cisteín proteasa dependiente de calcio que se activa en situaciones de excitotoxicidad. El procesamiento de NR2A da lugar a la aparición de fragmentos N-terminales estables, carentes del dominio de interacción con la maquinaria de señalización y el citoesqueleto, que interaccionan con NR1 en la membrana. Desconocemos si estos receptores truncados presentan alguna función en la neurona excitotóxica. La calpaína también es responsable, en ambos modelos, de la proteólisis de PSD-95, una proteína de andamiaje fundamental en la densidad postsináptica que interacciona con los NMDARs, favoreciendo su estabilidad en las sinapsis. Adicionalmente, se han desarrollado, y ya utilizado en los estudios anteriores, diferentes vectores lentivirales, que permiten la expresión específica y regulada de genes exógenos en neuronas.

Summary

The NMDA type of glutamate receptors (NMDARs) are highly permeable calcium channels playing fundamental roles in normal and pathological functioning of the CNS. Delayed neuronal death occurring in cerebrovascular and neurodegenerative diseases is mainly due to excitotoxic processes due to overstimulation of the NMDAR. In this work we have used an animal model of transient cerebral ischemia and primary cultures of cortical neurons to characterize the rapid, efficient and irreversible down-regulation of the NMDAR induced by excitotoxicity. The mechanism is different for the NR1 and NR2A subunits, both required for synaptic function and neuronal survival. In the case of NR1, we demonstrate the transcriptional inhibition of its coding gene while the NR2A subunits are extensively processed by calpain, a Ca^{2+} -dependent cysteine-protease activated in excitotoxic conditions. The resulting N-terminal NR2A fragment, lacking the domain required for interaction with the cytoskeleton and signaling proteins, is stable and still capable to interact with the NR1 subunit in the membrane. We do not presently know if these truncated NMDARs have any function in excitotoxic neurons. In both models, calpain also proteolyses PSD-95, a scaffolding protein of the post-synaptic density that interacts with the NMDARs favoring their synaptic stability. In addition, we have developed and already used in the above mentioned studies different lentiviral vectors which allow specific and regulated expression of exogenous genes in neurons.

Índice

ÍNDICE

ABREVIATURAS	11
INTRODUCCIÓN	14
1. LA ISQUEMIA CEREBRAL Y LA EXCITOTOXICIDAD NEURONAL.....	15
2. EL RECEPTOR DE GLUTAMATO DE TIPO NMDA.	16
2.1. Clasificación del NMDAR dentro de la familia de los receptores de glutamato.	16
2.2. Subunidades y estequiometría del NMDAR.....	17
2.3. Regulación de la transcripción y el procesamiento de NR1.	18
2.4. Regulación de la expresión génica y estructura de las subunidades NR2.....	21
2.5. Relevancia del NMDAR en la fisiología del SNC.....	22
2.6. Expresión temporal y regional del NMDAR en el SNC.....	23
2.7. Los NMDAR en la disyuntiva entre supervivencia y muerte neuronal.	25
2.8. Alteraciones patológicas de la función del NMDAR.....	25
3. SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE GENES EXÓGENOS EN NEURONAS.....	28
3.1. Los lentivirus como sistema de expresión.....	28
3.2. Sistemas de expresión duales, neuroespecíficos e inducibles.....	31
OBJETIVOS	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
1. Reactivos.....	36
2. Lista de tampones y soluciones.....	36
3. Anticuerpos.....	37
4. Vectores lentivirales.....	38
4.1. Generación de vectores de expresión dual.....	38
4.2. Generación de los vectores de expresión inducible.....	39
4.3. Clonaje de las subunidades NR2A y NR2B en el lentivirus.....	39
5. Generación de lentivirus.....	40
6. Titulación de los lentivirus por FACScan.....	40
7. Cultivos Primarios de neuronas.....	41
8. Infección de los cultivos primarios con lentivirus.....	41
9. Modelo animal de isquemia cerebral.....	41
10. Estudio de la viabilidad celular por el ensayo de MTT.....	42
11. Immunoblot.....	43
12. Inmunoprecipitación.....	43
13. Inmunofluorescencias.....	44
14. Inmunohistoquímica.....	44

15. Northern blot.	45
16. Ensayo de protección frente a RNAsas.	45
17. Ensayos de la actividad de promotores.	46
18. Análisis cuantitativo por PCR en tiempo real.	46
19. Marcaje metabólico de proteínas con ³⁵ S-metionina.	47
RESULTADOS.	49
1. MODELOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS, EN LA CARACTERIZACIÓN DE LOS PROCESOS DE EXCITOTOXICIDAD E ISQUEMIA.	49
1.2. Modelo animal de isquemia cerebral.	49
1.3. Modelo celular de excitotoxicidad neuronal.	50
2. DESARROLLO DE VECTORES LENTIVIRALES, PARA LA EXPRESIÓN DE GENES RECOMBINANTES EN NEURONAS.	53
2.1. Generación de vectores lentivirales que coexpresan dos proteínas recombinantes con especificidad neuronal.	53
2.2. Caracterización de la expresión del sistema dual en neuronas.	55
2.3. El sistema de expresión dual como base para la expresión de genes regulados en neuronas.	57
2.4. Caracterización de la cinética activación y bloqueo transcripcional en el sistema regulable con especificidad neuronal.	59
3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL NMDAR EN EXCITOTOXICIDAD E ISQUEMIA.	61
3.1. Regulación del NMDAR y de PSD-95 en la isquemia cerebral.	61
3.2. Regulación de la expresión de la subunidad NR1 en un modelo celular de excitotoxicidad.	63
3.3. Requerimientos de la estimulación del NMDAR para la regulación de NR1.	65
3.4. Disminución en los niveles de mRNA de NR1 en condiciones de excitotoxicidad. ...	67
3.5. Inhibición de la transcripción de NR1 por sobreactivación del NMDAR.	69
3.6. Regulación de la expresión del mRNA de NR1 en isquemia cerebral.	72
3.7. Regulación de las subunidades NR2A y NR2B en el modelo celular de excitotoxicidad.	74
3.8. Requerimientos de la estimulación del NMDAR para la regulación de las subunidades NR2.	77
3.9. La subunidad NR2A y PSD-95 son sustratos de la calpaína en neuronas maduras.	80
3.10. Análisis de la localización celular e interacciones de las formas truncadas de las subunidades NR2.	83
DISCUSIÓN.	91
CONCLUSIONES.	102
BIBLIOGRAFÍA.	104

ABREVIATURAS

ACM: arteria cerebral media

ActD: actinomicina D

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato

AraC: citosina β -D-Arabinofuranósido

BAPTA-AM: ácido 1, 2 bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético acetoximetil éster

BCA: ácido bicinconínico

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

CiIII: inhibidor III de la calpaína.

CRE: Elemento de respuesta a AMPc y Ca^{2+}

CREB: Proteína de unión a los elementos CRE.

D.E.: desviación estándar

DIV: día *in vitro*

DL-AP5: ácido 2-amino-fosfo-pentanoico

DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium

DsRed: Proteína roja fluorescente

DTT: ditiotreitól

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

EGTA: Ácido etilendiaminotetracético

FBS: suero fetal bovino

FSC: flujo sanguíneo cerebral

LTP: Memoria a largo plazo

GFP: Proteína verde fluorescente

GFAP: Proteína ácida fibrilar de la glía

MCAO: Oclusión de la arteria media cerebral

MTT: D, 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio

N-ALLM: N-acetil-leucil-leucil-metionina

N-ALLN: N-acetil-leucil-leucil-norleucina

NMDA: N-metil-D-aspartato

NMDAR: receptor para NMDA

NO: óxido nítrico

NR1: subunidad del receptor de glutamato para NMDA de tipo 1

NR2A: subunidad del receptor de glutamato para NMDA de tipo 2A

NR2B: subunidad del receptor de glutamato para NMDA de tipo 2B

PBS: solución salina tamponada con fosfato

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

SNC: sistema nervioso central

SYN: Promotor de sinapsina I humana.

TrK: Receptor tirosina kinasa de neurotrofinas relacionado con la tropomiosina

TrKB: Receptor de neurotrofina TrK tipo B

TTC: sal de tetrazolio (cloruro de 2,3,5-tetrafeniltetrazolio)

UT: unidad de transducción

WPRE: elemento de regulación postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota.

Introducción

INTRODUCCIÓN

Una de las prioridades de la Investigación Biomédica, desde el punto de vista de los países industrializados, es el estudio de las patologías humanas que afectan con mayor incidencia a sus ciudadanos y cuya prevalencia, debido a los cambios demográficos y al incremento en las expectativas de vida, es previsible que aumente todavía más en el futuro. Entre estas patologías se encuentran las enfermedades cerebrovasculares, que constituyen un problema sociosanitario de primer orden. En España, en concreto, los datos del Instituto Nacional de Estadística referidos al año 2002 muestran que el ictus cerebral es la primera causa de muerte en mujeres y la tercera en varones. Además, es el principal responsable de invalidez en adultos, y la segunda causa de demencia tras la enfermedad de Alzheimer.

La consecuencia más notable de las enfermedades cerebrovasculares es la muerte neuronal, debida en gran medida a procesos de excitotoxicidad iniciados por la estimulación excesiva de los receptores de glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NMDAR). Esta familia de receptores son, no obstante, muy importantes en la comunicación sináptica y, por tanto, en la fisiología de sistema nervioso central (SNC).

El objetivo fundamental de esta tesis doctoral ha sido profundizar en los mecanismos moleculares desencadenantes de esta forma de muerte neuronal. Para ello, hemos caracterizado de que manera la excitotoxicidad afecta a la expresión de los propios receptores neuronales que inician el proceso excitotóxico, y a otras proteínas relacionadas, también relevantes en la disyuntiva entre supervivencia y muerte neuronal. Estos estudios han sido realizados en un modelo celular de excitotoxicidad y en un modelo animal de isquemia cerebral, donde la excitotoxicidad ocurre *in vivo*. Los resultados obtenidos tienen un interés añadido por el hecho de que la excitotoxicidad también tiene un papel fundamental en un buen número de enfermedades neurodegenerativas de gran trascendencia médica y social.

Los estudios realizados desde una perspectiva fisiopatológica tienen la ventaja de que, al tiempo que profundizan en el conocimiento de los procesos normales y patológicos, permiten identificar nuevas dianas moleculares a explorar como herramientas terapéuticas. En el caso del ictus cerebral, y aquellas enfermedades neurodegenerativas donde la excitotoxicidad también juega un papel clave, esperamos contribuir a un diseño más racional de las terapias basadas en el uso de antagonistas del NMDAR, así como a identificar dianas alternativas de

neuroprotección. Además, en este trabajo, se han desarrollado y utilizado con éxito sistemas lentivirales de expresión que nos han permitido profundizar en la caracterización de la regulación de los NMDARs durante el proceso de excitotoxicidad. Esperamos que, en el futuro, estas herramientas sean de utilidad para la expresión eficiente y específica de proteínas con potencial neuroprotector *in vitro*, utilizando cultivos neuronales, o *in vivo*, mediante técnicas de inyección de los vectores virales y la generación de animales transgénicos.

1. LA ISQUEMIA CEREBRAL Y LA EXCITOTOXICIDAD NEURONAL.

Las enfermedades cerebrovasculares suponen la afectación transitoria o permanente de un área del encéfalo debido a un proceso isquémico o hemorrágico, originado por alteraciones patológicas en los vasos sanguíneos. Esto da lugar a la degeneración neuronal, producida por la disminución del flujo sanguíneo cerebral (FSC) y, con ello, de la disponibilidad de glucosa y oxígeno en el cerebro. Las alteraciones celulares se producen de forma secuencial y, en primer lugar, se impide la actividad funcional y se produce el llamado “fallo eléctrico” (Hossmann, 1999). Posteriormente, y conforme el FSC va disminuyendo, se suprime la actividad metabólica, lo que incluye sucesos como la inhibición de la síntesis de proteínas y del mRNA, la estimulación de la glicolisis anaeróbica, la reducción de la síntesis de ATP, la depolarización de las membranas celulares y la liberación de neurotransmisores al espacio extracelular.

En el tejido isquémico diferenciamos una región central necrótica o núcleo del infarto, separada del tejido normal por otra región coronal o zona de “penumbra”, caracterizada por ser funcionalmente silente pero intacta desde el punto de vista estructural. Sin embargo, si no se recupera el FSC en un periodo definido de tiempo denominado ventana terapéutica, esta región puede sufrir un proceso de degeneración neuronal retardada que da lugar a la expansión gradual del núcleo del infarto hacia la zona de penumbra isquémica. Existe un gran interés por conocer los mecanismos de la muerte neuronal retardada y la forma de bloquearla, para poder así atenuar el daño causado. Hasta la fecha, las terapias utilizadas en el ictus cerebral son insatisfactorias, y el único tratamiento de eficacia clínica probada es la trombolisis con activador tisular del plasminógeno (tPA), que contribuye en la restauración del FSC después de la isquemia. No obstante, la terapia trombolítica da lugar con relativa frecuencia a hemorragias intracerebrales sintomáticas (The_NINDS_t-PA_Stroke_Study_Group, 1997) y, además, el tPA presenta una toxicidad asociada que incrementa la degeneración neuronal en modelos experimentales (Wang et al., 1998b). Un problema adicional de este tipo de terapias es la

dificultad de conseguir clínicamente la recuperación del FSC dentro de la ventana terapéutica, lo que conlleva a la aparición de alteraciones del tejido cerebral posteriores a la reperusión del mismo. El mecanismo fundamental en la muerte neuronal secundaria es la excitotoxicidad (Olney, 1986), debida a la liberación de glutamato al espacio extracelular causada por la lisis de las neuronas del núcleo del infarto (Choi and Rothman, 1990). Puesto que el proceso excitotóxico también juega un papel importante en muchas otras patologías del SNC (Choi, 1988), es una diana fundamental en la búsqueda de estrategias de neuroprotección. Dentro de la familia de receptores de glutamato, los NMDARs son preponderantes en el proceso de excitotoxicidad (Hartley et al., 1993) y, por ello, muchas de estas estrategias están basadas en el uso de antagonistas de estos receptores. Así, trabajos recientes han mostrado resultados prometedores en el tratamiento de varios tipos de demencias, mediante el uso de la memantina (Chen and Lipton, 2006), un antagonistas no competitivo del NMDAR. Sin embargo otros antagonistas no han sido efectivos en el tratamiento de la isquemia cerebral (Ikonomidou and Turski, 2002) ni de otras enfermedades neurodegenerativas (Kemp and McKernan, 2002). Un paso crítico en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas es conocer por qué han fracasado los antagonistas del NMDAR en el tratamiento de estas patologías, y estudiar en profundidad cómo éstas moléculas pueden estar actuando sobre los NMDARs en un marco patofisiológico real.

2. EL RECEPTOR DE GLUTAMATO DE TIPO NMDA.

2.1. Clasificación del NMDAR dentro de la familia de los receptores de glutamato.

Entre los receptores para el neurotransmisor excitatorio L-glutamato pueden distinguirse dos familias, según el mecanismo de transmisión de la señal de activación:

- 1-** Familia de receptores metabotrópicos (mGluRs): formados por proteínas con siete segmentos transmembrana acoplados a proteínas G, que transducen la señal de unión del agonista al interior de la célula a través de una cascada de señalización mediada por segundos mensajeros intracelulares (Schoepp et al., 1990; Sugiyama et al., 1987).
- 2-** Familia de receptores ionotrópicos (iGluRs): canales iónicos acoplados a ligando. Tradicionalmente se han clasificado en tres subtipos, atendiendo a su afinidad por distintos agonistas sintéticos y sus características electrofisiológicas (Michaelis, 1998):
 - a.** Receptores de tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA).
 - b.** Receptores de tipo kainato

c. Receptores de tipo NMDA.

La estructura de los NMDARs es común a la de todos los receptores de la familia de iGluRs, y se presenta de forma esquemática en la Fig. 1. Son proteínas oligoméricas cuyas subunidades se componen de tres segmentos transmembrana completos (TM1, TM3 y TM4), y un dominio denominado TM2 en forma de horquilla, que atraviesa parcialmente la membrana (Kuner et al., 1996) y confiere las distintas selectividades iónicas del canal (Bigge, 1999). El extremo N-terminal de la molécula queda orientado al exterior celular y el C-terminal hacia el citoplasma (Paas, 1998; Wo and Oswald, 1995) (**Fig. 1A**).

2.2. Subunidades y estequiometría del NMDAR

Los NMDARs en el SNC están constituidos por distintos tipos de subunidades que provienen de 7 genes diferentes y que se clasifican, desde el punto de vista de su origen genético y función, en tres grupos (Dingledine et al., 1999): subunidades de tipo 1 (NR1 para las formas aisladas de rata y ζ 1 para las encontradas en ratón), subunidades tipo 2 (NR2A-D en rata y ϵ 1-4 en ratón) y subunidades de tipo 3 (NR3A y B en rata o χ -1 y χ -2 en ratón). La secuencia aminoacídica de las distintas subunidades del NMDAR tienen un alto grado de conservación, siendo la homología de aproximadamente un 20% entre las formas NR1, NR2 (Kutsuwada et al., 1992) y NR3 (Chatterton et al., 2002), y de un 50% al comparar las distintas subunidades NR2 (Ishii et al., 1993) o NR3 (Chatterton et al., 2002) entre sí.

Regiones equivalentes en los dominios extracelulares de NR1 y NR2 constituyen los sitios de unión para los coagonistas del receptor, que son respectivamente la glicina y el glutamato (**Fig. 1B**). Las subunidades están altamente glicosiladas y los NMDARs funcionales son, por tanto, glicoproteínas hetero-oligoméricas, probablemente tetrameros formados por homodímeros de NR1 y NR2 (**Fig. 1B y C**). La subunidad NR1 es un componente obligado del NMDAR e interacciona con alguna de las subunidades pertenecientes a la familia NR2 (A-D), consideradas como subunidades reguladoras o potenciadoras (Cull-Candy et al., 2001). Los distintos receptores así formados poseen propiedades fisiológicas diferentes (Hollmann and Heinemann, 1994). Las subunidades NR3 han sido menos estudiadas y probablemente actúen como dominantes negativos de la actividad del receptor (Ciabarra et al., 1995; Das et al., 1998; Sucher et al., 1995).

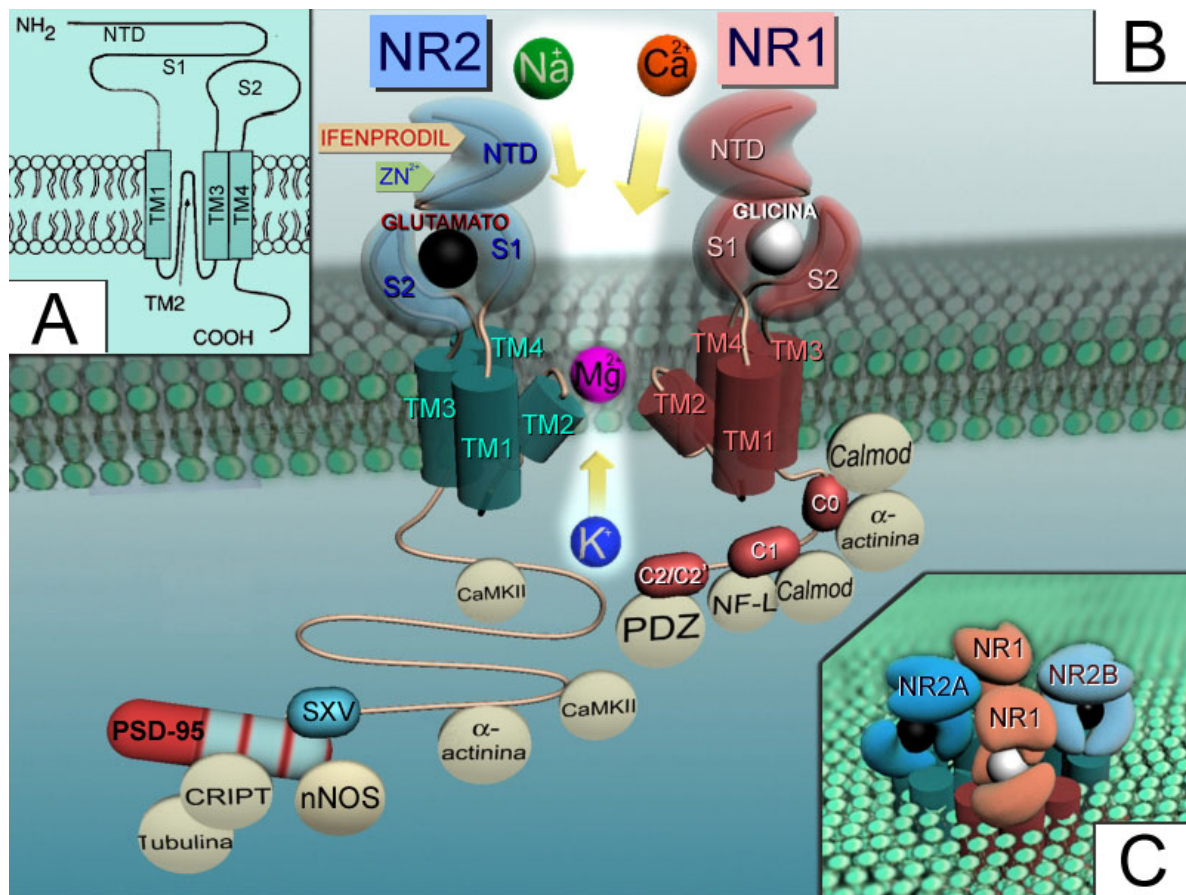


Figura 1. Estructura del NMDAR. **A**, Esquema general de la topología en la membrana de las subunidades pertenecientes a la familia de receptores ionotrópicos iGluRs. Las proteínas se localizan en la membrana plasmática mediante 4 regiones transmembrana TM(1-4), donde TM2 sólo la atraviesa parcialmente. El extremo N-terminal de las subunidades queda orientado hacia el exterior celular y el C-terminal hacia el citoplasma constituyendo un dominio de longitud variable. Dentro de las secuencias extracelulares, los 150 aminoácidos anteriores a TM1 (dominio S1) y el bucle entre TM3 y TM4 (dominio S2) constituyen las regiones de interacción con el ligando. También se distingue el dominio N-terminal (NTD). **B**, Modelo esquemático de la activación, modulación e interacciones del NMDAR. Formados por subunidades NR2 (A-D) y NR1, de elevada homología estructural. El receptor se activa en respuesta a la unión del agonista (glutamato o sustancias análogas como el NMDA) a las subunidades NR2, y de su coagonista glicina (o serina) a las subunidades NR1. Los cuatro dominios. Los 4 dominios transmembrana forman el canal iónico, permitiendo, tras el desbloqueo del Mg^{2+} , la salida de K^{+} y la entrada de Na^{+} y Ca^{2+} . El dominio TM2 se dispone hacia el interior del canal, aportando la especificidad iónica. Finalmente los dominios C-terminales citoplásmicos son muy variables. En el caso de las subunidades NR2, una región larga y compleja con secuencias de unión a proteínas de señalización y andamiaje de la PSD, como la Calmodulina Kinasa II (CaMKII), α -actinina y PSD-95. En este último caso, la interacción se establece entre la secuencia SXV del extremo C-terminal de NR2 con un dominio PDZ de los tres que existen en PSD-95. PSD-95 permite indirectamente la interacción del NMDAR con otras proteínas importantes, como la nNOS, o CRIP1, que a su vez interacciona con el citoesqueleto. El dominio C-terminal de NR1, aunque más corto, es también complejo, y su estructura depende del procesamiento alternativo. En general presenta dominios de unión a calmodulina y α -actinina y, cuando se expresan las unidades C1 y C2' puede interaccionar respectivamente con los neurofilamentos y con proteínas con dominios PDZ. **C**, Modelo de la estructura cuaternaria del NMDAR. El receptor está formado por dos subunidades de tipo NR1 y dos de tipo NR2, pudiendo coexistir dos subunidades NR2 diferentes y distintas isoformas de NR1 en la misma molécula de receptor. En el receptor maduro las subunidades interaccionan a través de sus dominios NTD y S1.

2.3. Regulación de la transcripción y el procesamiento de NR1.

El mRNA de NR1 comienza a detectarse en el cerebro de rata, a partir de los 14 días de desarrollo embrionario, aumentando sus niveles gradualmente hasta tres semanas después del

nacimiento (Laurie and Seeburg, 1994). La inducción transcripcional durante la diferenciación neuronal ocurre principalmente mediante la des-represión de su promotor, bloqueado inicialmente por la interacción de su elemento RE1 (*represor element-1*) con el represor REST/NRSF (*Represor element silencing transcription/neuron-restrictive silencer factor*), cuyos niveles disminuyen a lo largo de la diferenciación (Bai et al., 2003). Este represor es clave en la regulación de otros muchos genes neuronales (Lunyak and Rosenfeld, 2005). No obstante, también son necesarios mecanismos positivos para la expresión del gen de NR1. Así, por ejemplo, se ha descrito la implicación de factores de transcripción de la familia Sp1 (Bai and Kusiak, 1995), MAZ (Myc-associated zinc finger protein) (Okamoto et al., 2002), MEF2C (Myocyte-specific Enhancer-binding Factor-2C) (Kravinc et al., 1998), NFκB (Neuronal κB-Binding Factor) (Liu et al., 2004) y factores de crecimiento de la familia NGF (Nerve Growth Factor) que se unen a elementos NGFI/Egr (Nerve Growth factor-inducible/early growth reaction factor) (Bai and Kusiak, 1997) en el promotor de NR1. Además, se ha propuesto que la inhibición de Sp1 es necesaria para el silenciamiento por REST/NRSF de sus genes diana (Plaisance et al., 2005). En este contexto, es importante señalar que se ha demostrado la re-expresión de REST/NRSF en las neuronas destinadas a morir tras daño isquémico (Calderone et al., 2003), así como una disminución transitoria en los niveles de los factores de transcripción Sp1, Sp3 y Sp4 en un modelo de excitotoxicidad *in vitro* (Mao et al., 2002). En la región promotora del gen de NR1, también se ha descrito la presencia de tres dianas reconocidas por el factor de transcripción CREB (cAMP response element binding protein), críticas para su expresión (Lau et al., 2004). Esto es importante si tenemos en cuenta que la activación de CREB, como veremos, juega un papel fundamental en las respuestas celulares inducidas por estimulación del NMDAR.

Existen 8 variantes de procesamiento para el mRNA de NR1 (NR1-1a/4a y NR1-1b/4b) que difieren entre sí por la presencia o ausencia de una secuencia de 21 aminoácidos (N1: exon 5) en la región N-terminal, y el procesamiento diferencial de los exones 21 y 22 que da lugar a cambios en las secuencias de la región C-terminal (unidades C1, C2 y C2', ver **Fig. 1B**) (Hollmann and Heinemann, 1994; Zukin and Bennett, 1995). La región N1 es importante en la regulación de las propiedades del canal, ya que modifica su sensibilidad a espermina, al pH y al zinc (Dingledine et al., 1999). Por otra parte, los exones de la región C-terminal tienen un papel importante en la regulación y localización del NMDAR en la membrana celular. Así, el exón 21 codifica para C1, con residuos de Ser susceptibles de fosforilación por PKC y PKA, e involucrados en la regulación positiva de NR1 en respuesta a glutamato (Tingley et al., 1993) y

una diana para la interacción con calmodulina quinasa, que puede modular negativamente la actividad del NMDAR (Ehlers et al., 1996). Además, la región C1 presenta también sitios de interacción con neurofilamentos (Ehlers et al., 1998) y secuencias de retención en el retículo endoplásmico (RE) (Scott et al., 2001) que participan, respectivamente, en el posicionamiento y transporte de los NMDARs a la membrana. En el procesamiento del exón 22, el uso variable de un sitio aceptor hace posible la expresión, alternativamente, de dos unidades diferentes, C2 o C2'. En la unidad C2', los aminoácidos del extremo C-terminal constituyen un dominio de unión a proteínas PDZ (*Postsynaptic Density-95/Discs Large/Zonula Occludens-1-binding Motif*) (**Fig. 1B**), que permiten la asociación del NMDAR en *clusters* sobre la superficie celular (Okabe et al., 1999). Además, mediante la interacción con las proteínas PDZ, estos dominios pueden enmascarar las señales de retención en el RE presentes en C1, facilitando el transporte y ensamblaje de los NMDAR a la membrana (Scott et al., 2001). En algunas variantes C2', la pérdida adicional de la unidad C1, y la consecuente eliminación de las secuencias de retención en el RE, promueven aún más la llegada a la membrana de estas formas de NR1 (Standley et al., 2000). Adicionalmente existe una unidad C0, muy próxima a la región TM4, que es común para todas las formas de procesamiento de NR1, y que contiene secuencias de internalización que afectan a la expresión de esta subunidad (Scott et al., 2004).

La regulación del procesamiento alternativo de NR1 parece ser importante, ya que las distintas isoformas confieren al NMDAR diferencias notables en su funcionalidad. Así, por ejemplo, las distintas formas de procesamiento de NR1 tienen patrones diferentes de expresión espacial durante el desarrollo embrionario y en el cerebro adulto (Laurie and Seeburg, 1994). Más recientemente se ha demostrado que el procesamiento en el sitio C2/C2' está regulado por la actividad sináptica y que existe, por tanto, una relación mecánica entre el nivel de actividad, el procesamiento y el tráfico de subunidades a la membrana durante la modificación de sinapsis excitatorias. Otros trabajos han mostrado cambios en la expresión de las isoformas de NR1 en situaciones patológicas, como en un modelo experimental de seccionamiento del nervio óptico donde se inducen diferencialmente las isoformas NR1b, que aportan a las células afectadas una ventaja significativa para su supervivencia (Kreutz et al., 1998). En definitiva, resulta evidente que el tráfico y ensamblaje de las subunidades del NMDAR son procesos finamente regulados y que, particularmente en el caso de NR1 constituyen pasos críticos para su expresión en la membrana plasmática. De hecho, sólo un 40-50% de la subunidad NR1 aparece en la membrana de las neuronas de hipocampo en cultivo, frente a más del 90% para las subunidades NR2B (Hall and Soderling, 1997). Se ha sugerido la existencia de dos fracciones

diferentes de proteína NR1: la mayor parte queda retenida en el interior de la célula y es degradada con rapidez, y sólo una pequeña fracción tiene una vida media elevada comparable a las subunidades NR2A con las que interacciona (Huh and Wenthold, 1999).

2.4. Regulación de la expresión génica y estructura de las subunidades NR2.

Las regiones promotoras de las subunidades NR2 están poco caracterizadas. De forma similar a NR1, en el promotor de NR2A existen secuencias diana para los factores de transcripción de tipo Sp1 e islas CpG (Liu et al., 2003; Richter et al., 2002). En cuanto al procesamiento alternativo, existen 2 variantes para NR2D pero no hay otras formas conocidas para NR2A, B o C. Por tanto, como ya se ha comentado, las diferencias funcionales del NMDAR atribuibles a las subunidades NR2 derivan fundamentalmente del uso alternativo de los distintos genes. Esto confiere gran diversidad a las características de los NMDARs ya que, aunque el grado de conservación global de las distintas subunidades NR2 es elevado, la homología se concentra en las regiones transmembrana y los dominios de unión al agonista glutamato, mientras que el resto de la secuencia es muy variable.

En general, todas las subunidades NR2 presentan un dominio intracelular C-terminal mucho más extenso que el de las subunidades NR1. Mediante el análisis de ratones transgénicos que expresan formas truncadas de NR2, se ha demostrado que el extremo C-terminal es fundamental para la función y localización de estas subunidades en la membrana sináptica (Mori et al., 1998; Sprengel et al., 1998). Cerca de TM4 existen regiones que intervienen en la internalización dependiente de clatrina, y posterior degradación, de las subunidades NR2A y NR2B. Estas son similares a las que existen en NR1 y en las subunidades NR2C y NR2D (Scott et al., 2004). Se ha encontrado un segundo dominio de internalización en la región C-terminal distal de la subunidad NR2B (Roche et al., 2001), que se relaciona con la internalización y posterior reciclaje, en vez de la degradación, de esta proteína (Scott et al., 2004). En NR2B también existen secuencias de retención en el RE, similares a las de NR1, que podrían enmascararse mutuamente al asociarse las dos subunidades entre sí en el RE (Hawkins et al., 2004). Las subunidades NR2 además tienen en sus aminoácidos del extremo C-terminal dominios de interacción con proteínas PDZ (**Fig. 1B**) (Kornau et al., 1995), que no solo facilitan la asociación de los NMDARs en *clusters* sobre la superficie celular sino que al igual que sucede con NR1, pueden contribuir a su estabilidad al enmascarar los dominios de internalización.

Finalmente, la función de las subunidades NR2, de forma similar a NR1, está sujeta a regulación por fosforilación (Tingley et al., 1993). Así, la proteína kinasa dependiente de cAMP (PKA) y la proteína kinasa C (PKC) fosforilan *in vitro* residuos de Serina y Threonina en estas subunidades (Leonard and Hell, 1997), resultando en la modulación positiva de la actividad del receptor. Además, estas subunidades son sustratos de otras quinasas como Src y Fyn, que fosforilan residuos de Tirosina (Lau and Huganir, 1995; Moon et al., 1994; Sala and Sheng, 1999), y median en la susceptibilidad de NR2 a la proteólisis por calpaína. Esta cistein-proteasa neutra activada por Ca^{2+} (Vanderklish and Bahr, 2000) reconoce y proteoliza *in vitro* secuencias en los dominios citoplásmicos de NR2A y NR2B (Bi et al., 1998) y, como veremos, es importante en los procesos de excitotoxicidad e isquemia. Mientras que la fosforilación por Src de la preparación de membranas sinápticas reduce la proteólisis de NR2A y NR2B por calpaína, ésta es aumentada por Fyn (Rong et al., 2001). Al parecer, muchas de estas fosforilaciones ejercen su efecto dificultando la interacción de las subunidades del NMDAR con proteínas del citoesqueleto y PSD95 (Rong et al., 2001).

2.5. Relevancia del NMDAR en la fisiología del SNC.

El NMDAR juega un papel clave en procesos fisiológicos del SNC (Mori and Mishina, 1995). Se trata de receptores fundamentalmente postsinápticos, ampliamente distribuidos por el SNC, cuyos agonistas, como vimos, son los neurotransmisores glutamato y glicina. Sus subunidades se disponen en la membrana celular formando un canal iónico que se caracteriza por mostrar alta permeabilidad al Ca^{2+} y su bloqueo por Mg^{2+} de manera dependiente de voltaje (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). Los receptores funcionan en realidad como detectores de coincidencia, puesto que requieren para su activación la unión de ambos agonistas y la despolarización simultánea de la membrana (Hollmann and Heinemann, 1994; Hong et al., 1994a) (**Fig. 2**). La activación del receptor da lugar a la salida de K^{+} , y a la entrada de Na^{+} y fundamentalmente Ca^{2+} (Choi, 1992). La capacidad biológica de los NMDARs como canales iónicos les convierte en esenciales para los fenómenos de plasticidad sináptica, tales como la depresión a largo plazo (Long Term Depresión, LTD) y la potenciación a largo plazo (Long Term Potentiation, LTP), que parecen ser la base fisiológica de los procesos de memoria y aprendizaje (Collingridge, 1987). Lógicamente, los antagonistas de los NMDARs muestran efectos secundarios sobre el aprendizaje, pero también producen mareos, alucinaciones, ataxia y sedación.

Los NMDARs funcionales están generalmente embebidos en las densidades postsinápticas (PSD) donde establecen interacciones con múltiples proteínas de andamiaje y señalización (Kim and Sheng, 2004) (**Fig. 1B**). Estas proteínas ponen en marcha un sistema muy complejo de señales que incluye vías dependientes e independientes de calcio y que determinan el tipo de información que se transmitirá al interior celular. El conocimiento de la PSD es fundamental, por tanto, para el entendimiento del papel fisiológico o patológico del NMDAR.

Entre las proteínas de andamiaje es particularmente importante una de 95 kDa (PSD95), que participa en la localización correcta de los NMDARs en regiones sinápticas (Ziff, 1997) y permite el establecimiento de interacciones con estructuras del citoesqueleto, como los microtúbulos (Niethammer et al., 1998). PSD95 interacciona a través de sus dominios PDZ con el extremo C-terminal de las subunidades NR2 y algunas isoformas de NR1, permitiendo el acoplamiento del NMDAR con otras proteínas interaccionantes, como la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) (Brenman et al., 1996; Stricker et al., 1997) y las moléculas de adhesión celular (Sheng, 2001). Otras proteínas asociadas con el NMDAR son los receptores de neurotrofinas con actividad tirosina kinasa (Trk), con los que tiene relaciones funcionales. Así, la activación de TrkB a través de su unión a BDNF (brain-derived neurotrophic factor) tiene funciones muy importantes regulando la supervivencia, mantenimiento y crecimiento de las neuronas del SNC y del SN periférico (Bibel and Barde, 2000).

Secuencias en el dominio C-terminal citoplásmico de algunas subunidades del NMDAR también median la interacción con la espectrina cerebral, como PSD95 una proteína mayoritaria en la PSD, que ancla proteínas de membrana con el citoesqueleto de actina (Wechsler and Teichberg, 1998). Además, como vimos, estas regiones son diana de numerosas proteínas reguladoras que modulan tanto la actividad como la localización del receptor (Sheng and Pak, 1999; Takumi et al., 1999; Ziff, 1999).

2.6. Expresión temporal y regional del NMDAR en el SNC.

La distribución de las subunidades del NMDAR dentro del SNC es diferente: mientras que la expresión de NR1 es prácticamente ubicua, las distintas proteínas NR2 presentan un patrón de síntesis específico, que varía en las distintas regiones del SNC y durante el desarrollo. Así, NR2B predomina en el encéfalo, NR2A en el encéfalo y en el cerebelo, mientras que la

subunidad NR2D se distribuye ampliamente en el encéfalo, tálamo y cordón espinal y NR2C no se detecta en el hipocampo ni en la corteza cerebral, limitándose su expresión al cerebelo (Stephenson, 2001).

La composición del receptor a lo largo del desarrollo también está regulada, lo que se relaciona con cambios en su actividad, mostrando que los procesos necesarios para la correcta formación del SNC tienen lugar de una manera ordenada y regulada. La proteína NR1 es expresada en todos los estadios del desarrollo, mientras que las subunidades NR2 lo hacen con un patrón temporal muy diferente: durante el desarrollo embrionario temprano, se expresan subunidades NR2B en corteza e hipocampo (Li et al., 1998; Tovar and Westbrook, 1999). Antes del nacimiento, los NMDARs están constituidos únicamente por subunidades del subtipo NR2B o NR2D, mientras que la expresión de NR2A y NR2C es postnatal, predominando inicialmente en el encéfalo y extendiéndose posteriormente a las células granulares del cerebelo (Akazawa et al., 1994; Monyer et al., 1994; Watanabe et al., 1993). La importancia de la expresión temporal del NMDAR queda reflejada mediante diversos estudios realizados con ratones genéticamente modificados, en los cuales la expresión de las subunidades del receptor está inhibida. Los ratones en los que el gen para la subunidad NR1 ha sido completamente delecionado (NR1^{-/-}) no son viables, y mueren en estadios neonatales (8-15 días tras el nacimiento) pese a que la neuroanatomía es aparentemente normal (Forrest et al., 1994). Los mutantes nulos para el gen NR2B (NR2B^{-/-}) también mueren en estadios perinatales (Kutsuwada et al., 1996), sugiriendo que la combinación de subunidades NR1/NR2B es esencial en este periodo del desarrollo del SNC. Los ratones transgénicos que carecen de las subunidades NR2A, NR2C y NR2D sí son viables y han sido empleados para estudiar la funcionalidad de los receptores en animales adultos, observándose alteraciones en la memoria espacial y el aprendizaje (Ito et al., 1996; Kiyama et al., 1998; Sakimura et al., 1995).

Finalmente, la composición del NMDAR también varía con la localización dentro de la membrana celular: en las neuronas maduras existe una predominancia de subunidades NR2A en regiones de membrana correspondientes a las sinapsis (Monyer et al., 1994), mientras que en las regiones extrasinápticas predominan las subunidades del tipo NR2B (Li et al., 1998; Rumbaugh and Vicini, 1999; Tovar and Westbrook, 1999). Estas diferencias en su localización celular afectan a la función de los NMDARs, fundamentalmente en cuestiones relativas a la transmisión del impulso nervioso y a la viabilidad neuronal.

2.7. Los NMDAR en la disyuntiva entre supervivencia y muerte neuronal.

La localización de las subunidades NR2 en la membrana celular afecta, como hemos dicho, a sus propiedades biofísicas (Li et al., 2002) y tiene una gran relevancia en las respuestas biológicas. Así, la activación de los receptores sinápticos modifica la eficacia de la propia sinapsis y promueve la supervivencia neuronal, acoplada a la activación de CREB y a la expresión de BDNF (brain derived hemotrophic factor) (Hardingham et al., 2002; Papadia et al., 2005). Por el contrario, la estimulación de los NMDARs extrasinápticos junto con los sinápticos, tal como ocurre en el proceso de excitotoxicidad, activa una vía generalizada y dominante de inhibición de CREB que bloquea la inducción de BDNF y que está acoplada a vías de señalización hacia muerte neuronal (Hardingham et al., 2002) (**Fig. 2**). Por tanto, si bien es cierto que los NMDARs son fundamentales en la activación de vías de supervivencia, también juegan un papel importante en la señalización de muerte celular durante el proceso de excitotoxicidad. El desplazamiento de este delicado equilibrio hacia vías predominantemente de muerte juega un papel fundamental, como ya se ha comentado, en la degeneración neuronal asociada a muchas patologías del SNC.

2.8. Alteraciones patológicas de la función del NMDAR.

En diversas patologías del SNC, la exposición a concentraciones elevadas del neurotransmisor glutamato produce la entrada masiva de Ca^{2+} a través de los NMDARs. Este aumento de calcio intracelular desencadena el mecanismo de muerte celular conocido como excitotoxicidad (Choi, 1988; Hartley et al., 1993; Olney, 1986). La entrada inicial de este ión se ve agravada por la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, y por la liberación del ión almacenado intracelularmente en el RE y mitocondrias, producto de la acción de segundos mensajeros que se generan por la activación de los receptores de glutamato metabotrópicos. El aumento de la concentración de calcio citosólico resulta tóxico para la célula por mecanismos no completamente definidos, que incluyen el daño mitocondrial, el estrés de RE (Sattler and Tymianski, 2000) y, en general, la activación por Ca^{2+} de enzimas como la PKC, la fosfolipasa A_2 , fosfolipasa C, algunas endonucleasas, la proteína quinasa II dependiente de Ca^{2+} calmodulina, la nNOS y la calpaína. Además, la pérdida de la homeostasis de este ión se relaciona con un aumento de radicales libres, que pueden dañar a las proteínas celulares, al DNA y a las membranas lipídicas.

Como se mencionó anteriormente, la excitotoxicidad es un mecanismo fundamental en la muerte neuronal que ocurre asociada al proceso de isquemia cerebral. Un efector crítico en la isquemia es la calpaína (Hong et al., 1994a; Hong et al., 1994b; Siman and Noszek, 1988), como muestra el hecho del efecto neuroprotector de sus inhibidores en modelos experimentales de esta patología (Hong et al., 1994a). La calpaína resulta activada de forma temprana en isquemia, y existe un gran interés en determinar cuáles son sus sustratos y en qué forma su procesamiento contribuye al proceso isquémico. Recientemente se ha descrito que la activación de calpaína conduce al procesamiento, y consecuente inactivación, del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana (NCX) (Bano et al., 2005), el sistema más importante de eliminación del Ca^{2+} intracelular. La inactivación de CNX impide disminuir los niveles de Ca^{2+} intracelular hasta sus valores basales tras el incremento causado por la sobreactivación de los NMDARs. Por otra parte, p35, el regulador específico neuronal de la kinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) (Tsai et al., 1994), también es sustrato de la calpaína. La actividad regulada de p35/Cdk5 tiene un papel clave en la fisiología del SNC participando, por ejemplo en la migración neuronal, crecimiento de las neuritas, movilidad y adhesión celular, y plasticidad sináptica (Hahn et al., 2005; Kesavapany et al., 2004) y produciendo una forma truncada (p25) (Lee et al., 2000) Como se mencionó anteriormente, NR2A y NR2B también eran sustratos de la calpaína en experimentos realizados *in vitro* con enzima purificada (Bi et al., 1998) y, al menos NR2B, también en modelos celulares y animales de excitotoxicidad e isquemia (Simpkins et al., 2003). Las primeras evidencias se obtuvieron en sistemas heterólogos, donde se expresaron las subunidades NR1-1a y NR2A por transfección de células no neuronales. Así se formaron NMDARs funcionales en los que la sobreestimulación con glutamato dio lugar a la proteólisis, mediada por calpaína, de la subunidad NR2A (Guttmann et al., 2002). Sin embargo, previamente a los resultados presentados en esta tesis, no se había podido demostrar el procesamiento de las subunidades NR2A en situaciones de excitotoxicidad producidas en neuronas maduras *in vitro* e *in vivo* (Dong et al., 2004; Simpkins et al., 2003). Por el contrario, sí se observaba este procesamiento en neuronas inmaduras de hipocampo y corteza, así como el de NR2B independientemente del tiempo en cultivo (Dong et al., 2006). Una activación breve de los NMDARs con glutamato produce el procesamiento parcial de la subunidad NR2B, dando lugar a formas truncadas en su extremo C-terminal (Simpkins et al., 2003). Estas mismas observaciones han sido confirmadas en un modelo de isquemia focal transitoria (Simpkins et al., 2003). Como explicación de los diferentes resultados encontrados para NR2A y NR2B se sugirió que la asociación de NR2A a PSD95, que tiene lugar en la sinápsis durante la

maduración neuronal, podría proteger a esta subunidad de ser procesada por calpaína en neuronas maduras sometidas a excitotoxicidad (Dong et al., 2004).

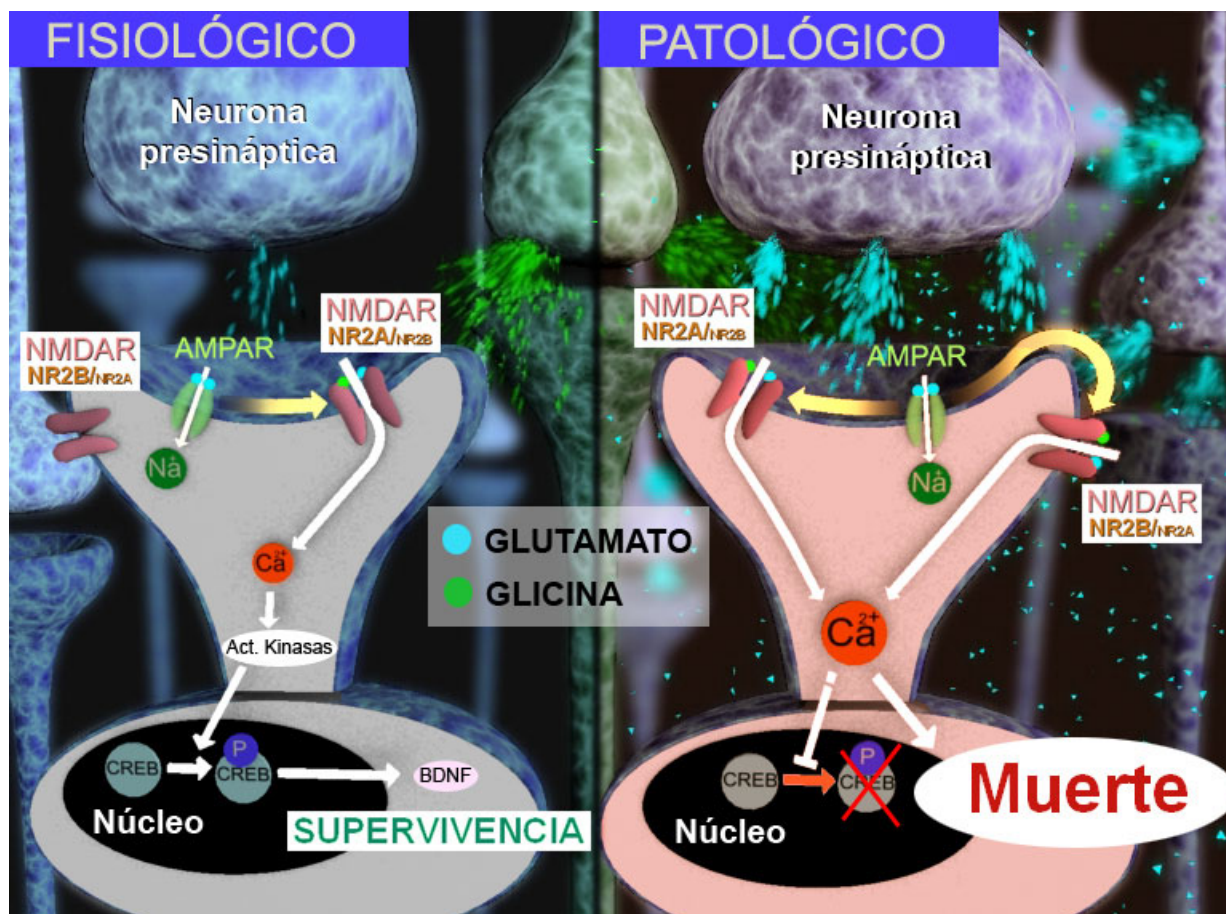


Figura 2. Papel dual del NMDAR en supervivencia y muerte neuronal. Representación de dos terminales sinápticos glutamatergicos, mostrando el funcionamiento del NMDAR en condiciones fisiológicas (izquierda) o patológicas (derecha). Las neuronas presinápticas se representan en la parte superior de la figura y una sección virtual de las postsinápticas en la inferior. En condiciones fisiológicas la liberación de los coagonistas del receptor glutamato (azul) y glicina (verde) da lugar a la activación de los NMDARs sinápticos. El glutamato es liberado desde el terminal presináptico, mientras que la glicina llega por difusión desde otros terminales pertenecientes a neuronas glicinérgicas. La activación del NMDAR requiere la despolarización simultánea de la membrana, que tiene lugar mediante la activación, también por glutamato, de los receptores de tipo AMPA y la entrada de Na^+ . En situaciones fisiológicas, la liberación de glutamato se restringe a la brecha sináptica, donde activa exclusivamente NMDARs sinápticos compuestos fundamentalmente por subunidades NR2 de tipo A. La activación de los NMDARs sinápticos produce una entrada moderada de Ca^{2+} , que induce la fosforilación de CREB, la inducción de BDNF y la activación de vías de supervivencia. En una situación patológica (derecha), una liberación masiva de glutamato al espacio extracelular activa también a los NMDARs extrasinápticos, donde predominan las subunidades NR2 de tipo B. En este caso, se alcanzan concentraciones muy elevadas de Ca^{2+} en las neuronas postsinápticas que producen un bloqueo en la activación de CREB y dan lugar a la activación de vías de muerte (Hardingham et al., 2002).

Aunque se acepta de forma general que la degeneración neuronal observada en isquemia cerebral se debe a procesos fundamentalmente necróticos, existen evidencias de que también tienen lugar procesos de muerte celular por apoptosis (Filipkowski et al., 1994; Linnik et al., 1993; MacManus et al., 1993) y, además, que ambos mecanismos están íntimamente ligados. Actualmente, la frontera entre los procesos de muerte celular por necrosis o apoptosis no está clara y prueba de ello es la estrecha relación entre la activación de calpaína, considerada

tradicionalmente asociada con la muerte por necrosis (Arora et al., 1996; Roberts-Lewis et al., 1994; Widdowson et al., 1997), y la de caspasas, centrales en la muerte apoptótica (Nicholson and Thornberry, 1997). Por una parte, ambos tipos de proteasas comparten muchos de sus sustratos, si bien estos son procesados de distinta manera (Wang, 2000; Wang et al., 1998a). Así por ejemplo, la espectrina (240 kDa) (Ref?) puede ser procesada por calpaína, dando lugar a la aparición de fragmentos estables de 150 y 145 kDa o por caspasas, produciendo polipéptidos de 150 y 120 kDa. Además, las caspasas son capaces de proteolizar e inactivar a la calpastatina, el inhibidor endógeno de la calpaína (Porn-Ares et al., 1998), mientras que ésta, a su vez, puede procesar y activar a la caspasa-3. De acuerdo con estos datos se ha demostrado la activación de caspasa-3 en apoptosis neuronal en modelos animales de isquemia y trauma agudo cerebral (Endres et al., 1998; Yakovlev et al., 1997), así como la activación de la calpaína en modelos celulares de apoptosis, pudiendo sus inhibidores bloquear este tipo de muerte celular (Squier et al., 1994).

En cualquier caso, la caracterización de la muerte neuronal por excitotoxicidad tiene una gran importancia, dado que no sólo juega un papel fundamental en isquemia sino que también es responsable de la destrucción neuronal asociada a los procesos de hipoxia, hipoglucemia, epilepsia y trauma agudo, así como en ciertas enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Choi and Rothman, 1990); Petersen et al, 1999; (Choi, 1988); (Meldrum, 1993). Además, la excitotoxicidad también participa en muchas patologías del ojo como el glaucoma, la retinopatía diabética, la neuropatía óptica isquémica y en traumatismos del nervio óptico (Sucher et al., 1997).

3. SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE GENES EXÓGENOS EN NEURONAS.

3.1. Los lentivirus como sistema de expresión.

La expresión de genes exógenos es una herramienta clave en los estudios de biología molecular y celular. Las técnicas de transducción génica, basadas en el uso de vectores virales, han fracasado a menudo en los sistemas neuronales, debido a la propia naturaleza de las neuronas. Al tratarse de células diferenciadas no proliferantes, no pueden ser transducidas por muchos de los vectores virales usados habitualmente con éxito en otros tipos celulares. A este problema se suma la baja eficiencia de la transfección génica en neuronas, que prácticamente

invalida también este sistema como método para realizar casi cualquier tipo de análisis bioquímico.

Los vectores lentivirales se han convertido en una herramienta muy prometedora para la transducción de genes exógenos en neuronas. Presentan importantes ventajas, como son su capacidad para infectar células proliferativas y no proliferativas, y la integración de su genoma viral en el de la célula huésped tras la retrotranscripción, donde permanecerá a lo largo de toda su vida y la de su progenie apenas sin problemas de silenciamiento génico (Lois et al., 2002; Pfeifer et al., 2002). Además, como vectores, estos virus tienen una gran capacidad de empaquetamiento, pudiendo encapsidar moléculas de RNA de hasta 10 Kb (Azzouz et al., 2002). En conjunto, estas propiedades los hace muy adecuados para la expresión eficiente de genes exógenos en neuronas en cultivo (Wong et al., 2006). Pero una ventaja adicional de los vectores lentivirales es la posibilidad de ser utilizados como herramienta en la generación de animales transgénicos, a partir de la infección, *in vitro*, de embriones en estadios muy tempranos de su desarrollo. Así, la utilización de los sistemas lentivirales en combinación, con promotores específicos para un determinado tipo celular, ha permitido generar animales transgénicos que expresan proteínas exógenas en un tejido u órgano de elección (Lois et al., 2002).

Los lentivirus se caracterizan por tener un periodo de incubación muy largo, y por esta razón su nombre, que define el género al que pertenecen, viene precedido del prefijo lenti-. Éste género se clasifica dentro de la familia *Retroviridae*, y en la subfamilia *Orthoretroviridae*. Los retrovirus, en general, presentan un genoma basado en RNA y se replican mediante la formación, por retrotranscripción, de un DNA provisional. Concretamente, los lentivirus tienen un genoma RNA linear monocatenario de sentido positivo. El genoma presenta cuatro genes principales, que son pol, gag, pro, y env, codificantes para la transcriptasa reversa y las proteínas del virión. En el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), a estos genes se les suman vif, vpr, vpu, tat, rev y nef (Fig. 3), cuyos productos proteicos están implicados en la regulación de la síntesis y el procesamiento del RNA vírico, así como otras funciones relacionadas con la replicación. Los extremos del genoma están flanqueados por las secuencias LTR (*Long Terminal Repeats*), implicadas en la recombinación del genoma viral en el genoma de la célula huésped. Ciertas mutaciones y modificaciones estructurales en el genoma de los lentivirus han permitido su utilización como vectores de expresión.

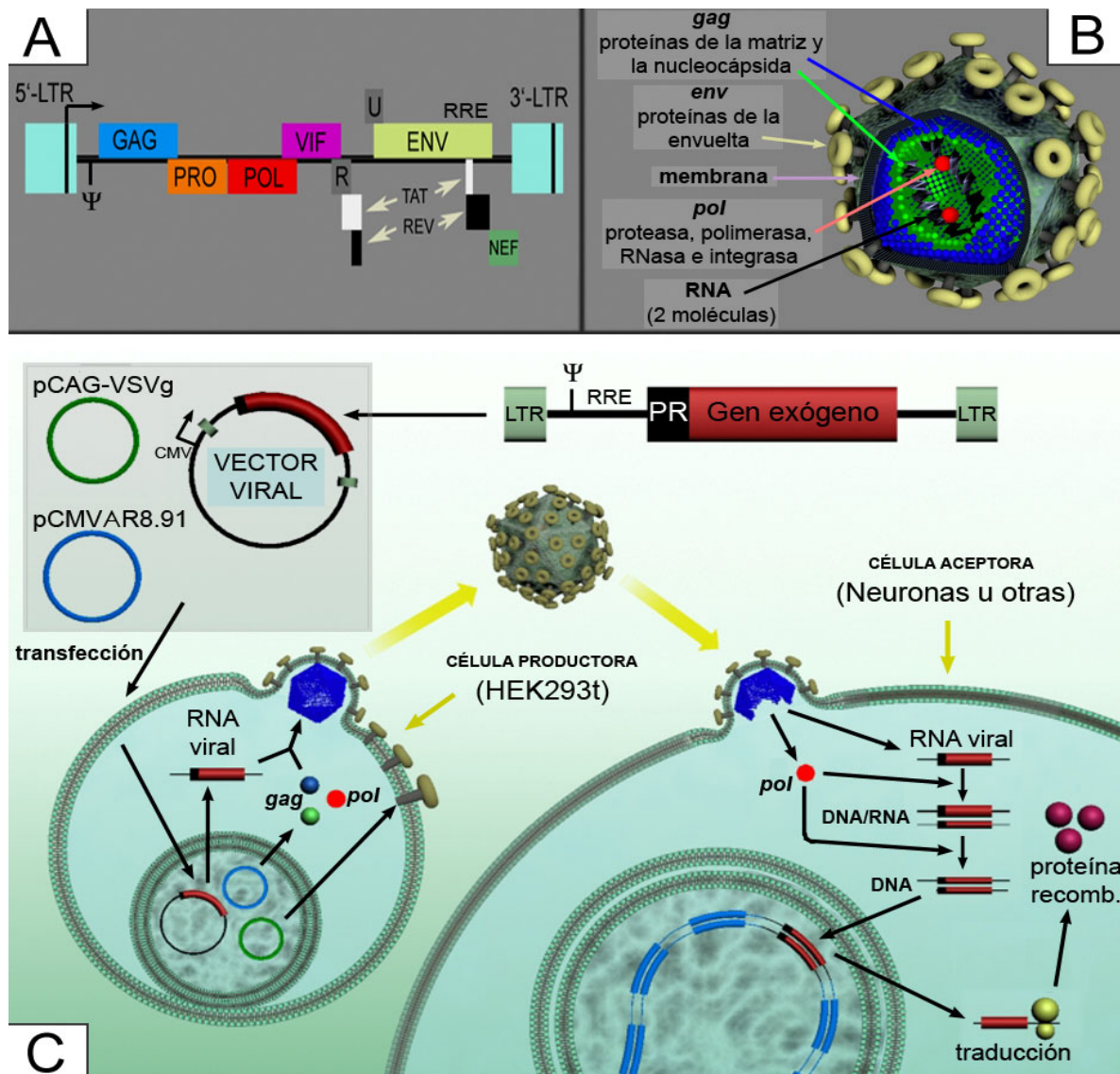


Figura 3. Biología de los lentivirus. **A**, representación esquemática del genoma viral del VIH, donde se muestran los genes principales, *pol* (transcriptasa en reverso, RNasaH e integrasa), *gag* (codificante para las proteínas de la matriz y la nucleocápsida), *pro* (proteasa necesaria para la maduración de *gag*) y *env* (proteínas de la envuelta), y los genes accesorios *vif* (implicado en la maduración del virión), *R* o *vpr* (detiene proliferación celular), *U* o *vpu* (disminuye la expresión de MHC I y CD4), *tat* (transactivador), *rev* (regulador del transporte de mRNAs virales al citoplasma) y *nef* (estimula proliferación y reduce los niveles de MHC I y CD4). Las secuencias LTR (*Long Terminal repeats*) flanqueantes intervienen en la recombinación viral, y en el extremo 5' se localiza la región promotora de la transcripción. Ψ es la secuencia reconocida para el empaquetamiento del genoma viral y RRE el elemento de respuesta a *rev*. **B**, modelo tridimensional de la organización del virión. Se representa una partícula vírica seccionada virtualmente para mostrar de forma esquemática la localización de los componentes más importantes. **C**, esquema de la generación y utilización de los lentivirus como vectores de expresión. El vector viral únicamente conserva del genoma viral las secuencias LTR necesarias para la integración en el genoma de la célula huésped y los elementos implicados en el exporte y encapsidación del mismo (RRE y Ψ). El promotor de la región 5'LTR ha sido inactivado por mutación (SIN) y un promotor CMV, localizado fuera de la secuencia del genoma viral, suple su función. Los genes restantes han sido sustituidos por un promotor eucariota y el gen exógeno que controla. Para la generación de los virus recombinantes es necesario contranfectar el vector viral junto con otros dos que codifican para la proteína de la envuelta (pCAG-VSVg), utilizando en este caso la proteína G de VSV, y otras proteínas estructurales y reguladoras (pCMV Δ R8.91). Las células transfectadas (HEK293T) son capaces de generar viriones, conteniendo las secuencias génicas (RNA) comprendidas entre los extremos LTR del vector viral y todas las enzimas necesarias para poder avanzar en un nuevo ciclo vírico hasta la fase de integración génica. Los viriones recogidos del medio de cultivo pueden ser utilizados para infectar los cultivos de las células aceptoras, donde las proteínas de la envuelta permiten la fusión de las membranas y la entrada del virión. Una vez en el citoplasma celular, el RNA viral se transcribe a DNA mediante la transcriptasa inversa y, posteriormente, viaja al núcleo donde se integra en el genoma de la célula huésped. A partir de este momento, la célula comenzará la expresión de la proteína recombinante controlada por el promotor utilizado.

Actualmente, los vectores lentivirales basados en el virus HIV tipo 1 son herramientas muy versátiles y con un alto grado de seguridad para su utilización en el laboratorio, careciendo de los genes responsables de la patogeneidad de cepas salvajes. En primer lugar, el genoma de partida para la obtención de los vectores lentivirales proviene de cepas no virulentas del HIV (White et al., 1999). Además se han eliminado aquellos genes auxiliares que no son necesarios para la generación y uso de los virus como vectores (como *vpr*, *vif*, *vpu* y *nef*). Por otra parte, para minimizar el riesgo de generación de virus competentes por recombinación, se han separado físicamente los genes necesarios para la generación de las partículas víricas en tres plásmidos distintos, que consisten en un vector conteniendo el gen exógeno que se desea expresar, otro que contiene los genes estructurales necesarios para la formación de los viriones y las enzimas reguladoras (*gag*, *pol*, *tat*, *rev*), y un tercer plásmido con los genes de la envuelta (Env) (**Fig. 3**). Para aumentar el rango de células transducibles por estos vectores lentivirales, se ha incluido como gen de la envuelta la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), que presenta un amplio espectro de dianas celulares (Naldini et al., 1996). Aunque la probabilidad de recombinación de estos tres plásmidos es extremadamente pequeña, se han tomado otras medidas adicionales que aumentan la seguridad de los sistemas lentivirales. Así, actualmente se utilizan cepas que presentan mutaciones SIN (*self inactivating*), que consiste en la delección de las secuencias correspondientes a la caja TATA y los sitios de unión a factores de transcripción de la región U3 del extremo 3' LTR (Long Terminal Repeat) (Miyoshi et al., 1998). Durante el proceso de retrotranscripción, en las cepas salvajes, esta secuencia es copiada al extremo 5' LTR y actúa como promotor permitiendo la reiniciación del ciclo viral después de la integración en el genoma de la célula huésped. Para permitir la expresión de los genes virales necesarios para la producción de las partículas víricas, habitualmente se incluye un promotor CMV fuera de la secuencia comprendida entre las regiones LTRs, por lo que no se integrará en el genoma de la célula huésped. Adicionalmente, la inserción de secuencias de poliadenilación en la región U5 de el extremo 3' LTR incrementa el título obtenido en el proceso de generación de los vectores lentivirales (Iwakuma et al., 1999).

3.2. Sistemas de expresión duales, neuroespecíficos e inducibles.

Muchas aproximaciones experimentales requieren de la expresión simultánea y eficiente de dos genes en la misma célula. Así por ejemplo, la expresión de proteínas recombinantes junto con otras fluorescentes facilita la identificación de las células que la expresan y el estudio de posibles efectos en la morfología de las células transducidas. Esta estrategia resuelve los

problemas encontrados en el uso de proteínas de fusión con GFP u otras proteínas fluorescentes, a menudo de fluorescencia débil y en las que además, la función de la proteína nativa puede resultar alterada por la fusión. La expresión de dos genes diferentes en la misma célula también es necesaria para el desarrollo de sistemas de expresión inducibles, siendo uno de ellos el codificante para el transactivador, y el otro el del gen que éste regula. Las estrategias experimentales basadas en el uso de secuencias internas de reconocimiento para los ribosomas (IRES) no son compatibles con el diseño de vectores para la expresión inducible de genes, y además son poco eficientes porque la expresión del segundo gen es normalmente menor que la del primero (Mizuguchi et al., 2000). Por otra parte, la capacidad de los lentivirus para empaquetar moléculas relativamente grandes de RNA los hace particularmente adecuados para la expresión de dos unidades génicas independientes, y ya se han desarrollado con éxito sistemas regulables basados en estos vectores (Kafri et al., 2000).

Un posible problema para el uso de estos vectores en el SNC es el hecho de que generalmente se trata de poblaciones heterogéneas, constituidas fundamentalmente por neuronas y células de glía, mayoritariamente astrocitos. Esta heterogeneidad se reproduce en la mayor parte de los cultivos primarios neuronales establecidos en el laboratorio. Por una parte, el uso de promotores ubicuos produce, simultáneamente, la transducción y expresión de proteínas recombinantes en neuronas y en las células de glía (Brun et al., 2003). Sin embargo, el uso de promotores específicos en combinación con los lentivirus hace posible la expresión limitada de las proteínas recombinantes en el tipo celular. Este tipo de estrategia ya se ha probado con éxito en el caso de los vectores adenovirales que mediante el uso de promotores específicos dirigen la expresión a neuronas o astrocitos (Ralph et al., 2000). Uno de los promotores que ha dado mejores resultados para la expresión de proteínas recombinantes con especificidad neuronal, *in vitro* e *in vivo*, es el del gen de la sinapsina humana (Kugler et al., 2001; Nakagawa et al., 2006) que, adicionalmente, debido a su pequeño tamaño, es especialmente utilizable para el diseño de vectores duales.

En este trabajo, hemos desarrollado un nuevo sistema de expresión, basado en el uso de lentivirus, que posibilita la expresión de dos unidades génicas con la especificidad neuronal. El sistema se ha puesto a prueba expresando simultánea y eficientemente de dos proteínas fluorescentes con elevada especificidad neuronal en cultivos mixtos de neuronas y células gliales. A partir de estos vectores hemos generado también un sistema de expresión regulable por tetraciclina (Tet) y con especificidad neuronal.

Objetivos

OBJETIVOS

Los objetivos generales de esta tesis son:

- 1- Profundizar en los mecanismos moleculares de la muerte neuronal por excitotoxicidad, analizando en que manera afecta este proceso a la expresión de proteínas relevantes en la disyuntiva entre supervivencia y muerte neuronal.
- 2- Identificar nuevas dianas moleculares de neuroprotección para el ictus cerebral que permitan explorar nuevas herramientas terapéuticas y contribuir en el diseño racional de terapias basadas en el bloqueo de los NMDARs.

Dentro de estos objetivos fundamentales, podemos distinguir dos objetivos más específicos:

- 1- Caracterizar como afecta la excitotoxicidad a la expresión de los propios receptores neuronales que inician el proceso excitotóxico, los NMDARs, así como a otras proteínas relacionadas. Para ello, usaremos un modelo celular de excitotoxicidad y un modelo de isquemia cerebral transitoria en rata, donde este proceso tiene lugar *in vivo*.
- 2- Diseñar y desarrollar vectores lentivirales con capacidad para expresar genes recombinantes de forma neuroespecífica y regulada. Estos vectores serán utilizados para estudiar la función de genes en el SNC y valorar el potencial neuroprotector de las dianas moleculares identificadas.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Reactivos.

Los antagonistas del NMDAR ácido 2-amino fosfopentanoico (DL-AP5) e ifenprodil se adquirieron en Tocris-Cookson (Bristol, UK). Los agonistas N-Metil-D-Aspartato (NMDA), glutamato, glicina, los compuestos actinomicina D, 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), Ara-C (citosina β -D-arabino-furanósido), poli-L-lisina y L-laminina, los inhibidores de proteasas N-ALLN (N-acetil-leucil-leucil-norleucina, inhibidor de calpaína I) y N-ALLM (N-acetil-leucil-leucil-metionina, inhibidor de calpaína II), y los marcadores de peso molecular para SDS-PAGE “Prestained SDS Molecular Weight Marker”s { α_2 -macroglobulina (180 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fructosa-6-fosfato quinasa (84 kDa), piruvato quinasa (58 kDa), fumarasa (48 kDa), lactato deshidrogenasa (36 kDa), triosa fosfato isomerasa (26 kDa)} se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO). El carbobenzóxi-valinil-fenilalanina (Inhibidor de Calpaína III, referenciado como CiIII), el inhibidor genérico de caspasas z-VAD-FMK, el análogo de tetraciclina doxiciclina y el quelante de calcio BAPTA-AM se obtuvieron de Calbiochem (Darmstadt, Alemania). El reactivo BCA para determinación de la concentración de proteína se obtuvo de Pierce (Rockford, IL). Para la inmunodetección de inmunocomplejos en los *immunoblots*, se utilizó el kit de bioluminiscencia de Perkin-Elmer Life Sciences (Boston, MA).

2. Lista de tampones y soluciones.

- Tampón PBS: NaCl 136mM, KCl 2mM, Na₂HPO₄ 8mM, (pH 7.4).
- Tampón de bloqueo: PBS, Leche de vaca 5%.
- Tampón TBS: Tris-Cl 20 mM (pH 7.5), NaCl 137mM.
- Tampón TBST: TBS, Tween-20 0.5%.
- Tampón de electroforesis: Tris 25mM, glicina 250mM (pH 8.3), SDS 0.1%.
- Tampón de carga de electroforesis: Tris-Cl 50mM (pH 6.8), ditioneitol (DTT) 100mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0.005%, glicerol 10%.
- Tampón de transferencia: Tris 25mM, glicina 250mM (pH 8.3), metanol 10%.
- Inhibidores de proteasas: PMSF 1 mM, 1,10-fenantrolina 0.2 mM, pepstatina A 10 μ g/ml, leupeptina 10 μ g/ml, aprotinina 10 μ g/ml y benzamidina 10 mM

- Tampón RIPA: Na_2HPO_4 10mM (pH 7.2), NaCl 150mM, DOC 1%, NP-40 1%, SDS 0.1% e inhibidores de proteasas.
- Tampón de lisis para Inmunoprecipitación: Tris-Cl 20mM (pH 8), NaCl 80mM, EDTA 20mM, 1% NP-40 e inhibidores de proteasas.

3. Anticuerpos.

- La subunidad NR1 se detecta con un anticuerpo monoclonal obtenido utilizando la secuencia comprendida entre los residuos 660-881, localizada en el bucle extracelular entre las regiones TM3 y TM4 (Pharmingen, San Diego, CA). Se utilizó una dilución 1:1000 para *immunoblot* (IB), y 1:200 para inmunofluorescencia (IF). En los experimentos de inmunohistoquímica (IH) se utilizó un anticuerpo policlonal específico para las isoformas de NR1 que contienen la región C1 (NR1-1a/b y NR1-3a/b) (Chemicon, Temacula, CA) a una dilución 1:1000.

- Las subunidades NR2A y NR2B se detectan con anticuerpos policlonales de conejo dirigidos a secuencias conservadas de sus regiones N-terminal (Pharmingen, San Diego, CA) o C-terminal (Chemicon, Temacula, CA). Las diluciones fueron las siguientes:

NR2A/B (N-ter): 1:1000 (IB) y 1:200 (IF)

NR2A/B (C-ter): 1:1000 (IB), 1:200 (IF) y 1:100 (IH)

También utilizamos un anticuerpo polyclonal de cabra específico para la región C-terminal de la subunidad NR2A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) a diluciones 1:50 (IB), 1:10 (IF) y 1:20 (IH).

- Para la inmunofluorescencias, el epítipo de hemaglutinina (HA) fue reconocido con un anticuerpo monoclonal (Covenant Research Products, Verkeley, CA) utilizado a una dilución 1:2000, y en los experimentos de inmunodetección en filtro, se usó un policlonal de conejo (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) a una dilución de 1:5000.

- Utilizamos además los anticuerpos monoclonales específicos para la proteína nuclear neuronal (NeuN) (Abcam, Cambridge, UK) a diluciones 1:100 (IF) y 1:50 (IH), para β III-tubulina (clon Tuj-1) (Covance, Verkeley, CA) a diluciones 1:15000 (IB) y 1:5000 (IF) y para β -actina (Sigma Co., St. Louis, MO) a dilución 1:1000 (IB).

- También se han usado otros anticuerpos policlonales de conejo específicos para GFAP (Chemicon, Temacula, CA) a diluciones de 1:5000 (IB) y 1:1000 (IF), y para GFP (Molecular Probes, Eugene, OR) a una dilución 1:500 (IF).

- En los experimentos de *immunoblot* se utilizaron anticuerpos secundarios de cabra acoplados a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) a una dilución de 1:5000.

- Finalmente, en los experimentos de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica se usaron los anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 647 o Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Eugene, OR)

4. Vectores lentivirales.

4.1. Generación de vectores de expresión dual.

Para generar los vectores de expresión dual se partió del vector lentiviral pLL 3.7 (Rubinson et al., 2003), generosamente cedido por el Dr. Luk Van Parijs. La secuencia del promotor del gen humano de sinapsina I fue amplificada por PCR, a partir del vector pMH4-I-SYN-EGFP (Kugler et al., 2001), amablemente cedido por el Dr. Kügler (Universidad de Tübingen, Alemania). Se utilizaron cebadores específicos conteniendo secuencias adicionales para su reconocimiento por las enzimas de restricción XbaI y HpaI, que permiten sustituir al promotor U6 del vector pLL3.7 por el de sinapsina, o NsiI y NheI, para sustituir al promotor CMV. El vector resultante **LV-SYN-SYN-GFP** tiene dos unidades de expresión, controlados por dos promotores de sinapsina, y el gen codificante para la GFP bajo el control del segundo de los promotores, seguido por la secuencia estabilizadora WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element), que aumenta la expresión modificando la poliadenilación, exportación y la traducción de los RNAs (Donello et al., 1998). A continuación, para favorecer la expresión del gen que se clone en primera posición se insertó una segunda copia de la secuencia WPRE tras el primer promotor de sinapsina. Para ello se usaron cebadores específicos de WPRE conteniendo secuencias reconocidas por las enzimas de restricción NotI y NsiI que facilitaron su clonaje en la posición mencionada. Finalmente el vector **LV-SYN-DsRed-SYN-GFP** (Fig 6A) fue derivado del anterior introduciendo la secuencia codificante para la proteína fluorescente DsRed inmediatamente después del primer promotor de sinapsina. Para ello, se amplificó por PCR el gen DsRed partiendo del vector

pDsRed-N1 (Clontech), usando cebadores con secuencias de corte para las enzimas NotI y XhoI. Los vectores con un solo promotor **LV-SYN-DsRed** y **LV-SYN-GFP** fueron obtenidos seleccionando, respectivamente, fragmentos NotI-EcoRI y XbaI-NotI en el vector dual **LV-SYN-DsRed-SYN-GFP**.

4.2. Generación de los vectores de expresión inducible.

En primer lugar, partiendo del vector pTRE (Clontech, Takara Bio Inc., Kyoto, Japón), se amplificó por PCR la secuencia del promotor inducible por tetraciclina (Tet) $P_{hCMV^{*-1}}$, que contiene un elemento de respuesta a Tet (TRE) formado por siete copias de la secuencia operadora Tet (TetO) seguido del promotor mínimo de CMV (P_{minCMV}). El promotor inducible fue clonado en el vector LV-SYN-DsRED-SYN-GFP, entre las dianas de restricción NsiI y AscI, sustituyendo al segundo promotor de sinapsina. En un segundo paso, se sustituyó el gen de la DsRed por el transactivador controlado por Tet tTA, obtenido por PCR a partir del vector pTet-OFF (Clontech, Takara Bio Inc., Kyoto, Japón), y subclonado con las enzimas de restricción BamHI y NotI. Así se obtuvo el vector inducible y neuroespecífico **LV-SYN-Tetoff-GFP** (Fig.8A). Hemos generado también un segundo vector inducible, que no es neuroespecífico, **LV-SV40-Tetoff-GFP**, sustituyendo el promotor de sinapsina en LV-Syn-Tetoff-GFP, mediante la enzima XbaI por el promotor temprano de SV40, obtenido por PCR a partir del vector pRL-SV40 (Promega, Madison, WI).

4.3. Clonaje de las subunidades NR2A y NR2B en el lentivirus.

El plásmido YFP-NR2B, generosamente donado por el Dr. J.Luo (Zhejiang University School of Medicine, China), codifica para la subunidad NR2B fusionada con la proteína fluorescente YFP, insertada entre los codones quinto y sexto después de la supuesta secuencia del péptido señal (Qiu et al., 2005). Los plásmidos pME18S-HA-NR2A y pME18S-HA-NR2B fueron generosamente cedidos por el Dr. T. Yamamoto (University of Tokio, Japan) y contienen, respectivamente, la secuencias codificantes para los genes NR2A de rata y NR2B de ratón, con epítopos HA insertados en sus extremos N-terminal, entre los aminoácidos 51 y 52 para NR2A (Hironaka et al., 2000), y 66 y 67 para NR2B (Nakazawa et al., 2001). El plásmido SYN-DsRed-SYN-GFP fue usado como vector para el subclonaje de NR2A y NR2B. El vector **SYN-HA-NR2A** se generó clonando un fragmento EcoRI-SpeI del plásmido pME18S-HA-NR2A sustituyendo la región, desde el término del primer promotor de sinapsina hasta el final

de la secuencia codificante para EGFP. Para el subclonaje de NR2B, primero fue necesario introducir un sitio NotI previo al codón de iniciación en los vectores pME18S-HA-NR2B y pYFP-NR2B. Para ello, realizamos mutagénesis con los oligonucleótidos 5'-CAT GCT CTC TCC CTT AAT **GCG GCC GCC** TAG AGG TTT GGC G-3' y 5'-CGC CAA A C CTC TAG **GCG GCC GCA** TTA AGG GAG AGA GCA TG-3', donde los nucleótidos mutados se marcan en negrita y se subraya el sitio reconocido por la enzima de restricción NotI. Posteriormente los fragmentos NotI y SpeI de YFP-NR2B y HA-NR2B se insertaron en el vector viral para obtener los plásmidos **SYN-HA-NR2B** y **SYN-YFP-NR2B**.

5. Generación de lentivirus.

Los virus recombinantes se produjeron por triple transfección en células HEK293T del vector lentiviral y dos vectores de empaquetamiento: pCAG-VSVg, un plásmido que codifica para la proteína de la envuelta VSV-G, y el vector pCMVΔR8.91, un plásmido que contiene los genes gag/pol, tat y rev de HIV-1. Los medios de cultivo conteniendo las partículas víricas se recogieron 48-60 h después de la transfección, de acuerdo con Lois et al. (2002) y se concentraron usando columnas de filtración (Centricon Plus-20, para pesos moleculares de 100 kDa; Millipore). La titulación de los virus se realizó en líneas celulares, mediante FACScan, en el caso de los virus que codifican proteínas fluorescentes (DsRes y/o GFP), y mediante conteo de neuronas positivas en cultivos primarios por inmunofluorescencia con anticuerpos específicos, cuando estos virus expresaban proteínas recombinantes de NR2A o NR2B.

6. Titulación de los lentivirus por FACScan.

Para titular los lentivirus que expresan proteínas fluorescentes hemos usado el protocolo del Dr. Didier Trono (Departamento de genética y microbiología, CMU, Suiza) descrito en la Web de tronolab (Lentiweb.com). No obstante, salvo para el vector LV-SV40-Tetoff-GFP, en el resto de los casos utilizamos células PC12 y no HEK293, dado que esta línea celular permite la expresión del gen de sinapsina humana I (Thiel et al., 1991). El porcentaje de células positivas se analizó mediante FACScan (B-9320 Becton Dickinson), en los canales rojo y verde para detectar las proteínas DsRed y EGFP respectivamente. Finalmente se cuantificaron los datos obtenidos mediante el programa *BD CellQuest Pro*.

7. Cultivos Primarios de neuronas.

Los cultivos primarios de neuronas se realizaron como se ha descrito previamente (28-R2), con algunas modificaciones. Las placas fueron pretratadas con poly-L-lysina (100 µg/ml) y laminina (4 µg/ml) durante una noche a 37°C antes de su utilización. Las cortezas cerebrales se extrajeron de embriones de ratas (Wistar) de 18 días de gestación, que fueron diseccionadas y disociadas mecánicamente en medio de cultivo (Eagle Minimum Medium suplementado con NaHCO₃ 28.5 mM, glucosa 22.2 mM, glutamina 0.1 mM, suero bovino fetal (FBS) 5% y suero de caballo (HBS) 5%). Las células se sembraron a una densidad de $0,3 \times 10^6$ células/cm² en el mismo medio. Para inhibir el crecimiento de las células gliales se añadió AraC 10µM al cultivo a 7 días *in vitro* (DIV). Finalmente las células se trataron, salvo que se indique lo contrario, a 14 DIVs con las siguientes concentraciones de reactivos: NMDA 100 µM, glicina 10 µM, DL-AP5 200 µM, ifenprodil 10 µM, N-ALLN 5 µM, N-ALLM 5 µM, zVAD 100 µM, BAPTA-AM 40 µM, EGTA 2 mM o CiIII 10 µM. Las subunidades NR2, expresadas en neuronas corticales a este tiempo en cultivo son NR2A y NR2B (Li et al., 1998).

8. Infección de los cultivos primarios con lentivirus.

Los cultivos primarios se infectaron mediante la adición al medio de crecimiento de la suspensión viral, normalmente a 7 DIVs, salvo en el caso de los lentivirus inducibles, en los que se hizo a 1 DIV. Los tratamientos con NMDA y glicina, cuando se requería, se realizaron 7 días después de la infección (14 DIVs).

9. Modelo animal de isquemia cerebral.

Todos los procedimientos realizados en esta tesis con animales están de acuerdo con la ley de la Comunidad Europea 86/609/EEC y fueron aprobados por el comité de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. La cirugía necesaria en este modelo se realizó por la Dra. Mónica Sobrado, gracias a una colaboración con el grupo del Dr. J.M. Roda de la Unidad Cerebrovascular del Hospital La Paz de Madrid. Las ratas adultas macho del género Sprague-Dawley (275-300 gr) se anestesiaron con una solución de diazepam (5 mg/Kg), hidrocloreuro de Ketamina (ketolar, 62.5 mg/Kg) y atropina (0,25 mg/Kg), administrados por inyección intraperitoneal. En primer lugar se canuló la arteria femoral para permitir el muestreo

constante de la sangre y la monitorización de la presión arterial. El pH, los gases y la glucosa en sangre antes de la oclusión, 15 min después de la misma, y también 10 min después de iniciada la reperusión. La temperatura del cuerpo y del cerebro de la rata se mantuvieron a 37 ± 0.5 °C y 36 ± 0.5 °C, respectivamente, en todo momento. Las variables fisiológicas estudiadas no se modificaron significativamente por la oclusión (datos no mostrados). El procedimiento quirúrgico utilizado fue una variante del descrito por Chen et al., (1986) (Chen et al., 1986) y Liu et al., (1989) (Liu et al., 1989). En primer lugar se realizó una pequeña craneotomía sobre el tronco de la ACM, por encima de la fisura rinal, y se ligó la arteria con una sutura monofilamento de 9-0 (Nylon, S&T) justo antes de la bifurcación de las ramas frontal y parietal. La interrupción del flujo sanguíneo fue confirmada mediante microscopio quirúrgico. A continuación, se ocluyeron también dos arterias carótidas comunes. Las tres arterias permanecieron ocluidas durante 60 min y, a continuación, se permitió la reperusión sanguínea durante los tiempos indicados. Finalmente, los animales fueron sacrificados mediante la inhalación de una sobredosis de halotano y decapitados. Los animales control “sham-operated” fueron sometidos tan sólo a la anestesia y al procedimiento quirúrgico, sin la oclusión de las arterias. Para preparar extractos de proteína, los cerebros fueron seccionados coronalmente en rodajas de 2 mm y teñidos con una solución al 2% de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) (Merk Bioscience). El área infartada quedó definida como una región hipocromática en la corteza cerebral del hemisferio derecho, que fue diseccionada junto con la región correspondiente del hemisferio izquierdo. Para los experimentos de inmunohistoquímica, 24 h después de la reperusión, las ratas fueron anestesiadas como previamente y perfundidas intracardiamente con paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7,4) a 4° C. A continuación, los cerebros fueron extraídos y fijados en la misma solución durante 6 h adicionales a 4 °C. Entonces su estructura se preservó frente a la congelación por inmersión en soluciones de sacarosa de concentraciones crecientes (10%, 15% y 20%), preparadas en PBS y a 4 °C. Finalmente, se prepararon secciones coroneales (25 μ m de grosor) utilizando un criostato (Leica, Heidelberg, Alemania) que se procesaron para la inmunohistoquímica.

10. Estudio de la viabilidad celular por el ensayo de MTT.

Para medir la viabilidad celular utilizamos el ensayo de la reducción de la sal de tetrazolio MTT (Acuñar). Para ello añadimos MTT (0.5 mg/ml) al medio e incubamos las células durante 4 h a 37 °C. El MTT es reducido por la actividad mitocondrial de las células con metabolismo activo, formando cristales de formazán que son solubilizados mediante la adición de SDS al

5% y HCl 5 mM. La cuantificación de las sales de formazán producidas se realiza mediante espectrometría a 570 nm. La contribución de las células gliales existentes en los cultivos mixtos a la absorbancia se estableció por exposición de cultivos paralelos durante 24 h a NMDA 400 μ M y glicina 10 μ M. En estas condiciones se induce la muerte neuronal prácticamente por completo, sin afectar a la viabilidad de las células gliales. Posteriormente, para calcular la viabilidad de las sometidas o no a distintos tratamientos, dicho valor fue sustraído de todas las medidas realizadas.

11. Immunoblot.

La lisis de los cultivos mixtos se realizó en tampón RIPA conteniendo inhibidores de proteasas. Las muestras de cerebro se lisaron en el mismo tampón modificado para contener SDS 1% y DTT 1 mM, así como idéntica combinación de inhibidores de proteasas. Los extractos se incubaron durante 30 min en hielo y los restos celulares fueron eliminados por centrifugación. La concentración de proteína contenida en cada extracto se cuantificó con el reactivo BCA. La separación electroforética de cantidades equivalentes de proteína se realizó en geles de poliacrilamida al 8-12% en condiciones desnaturalizantes {Laemmli, 1970}. Como marcadores de peso molecular se utilizaron los preteñidos de Sigma, como se indicó previamente. Para los ensayos de inmunodetección en filtro, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BAB5 Schleicher & Schuell, Dasell, Alemania) en forma sumergida a una intensidad de corriente de 400 mA (150 v) durante 1 h. Tras ello, las membranas se tiñeron con una solución de rojo Ponceau al 1%, preparado en ácido acético al 1%, para verificar la homogeneidad de la transferencia. Una vez eliminada la tinción, las membranas se lavaron con TBST y se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora con leche desnatada al 5% en TBST. La inmunodetección de las proteínas se realizó mediante procedimientos estándar usando anticuerpos primarios y secundarios diluidos en solución de bloqueo, como se indicó anteriormente. Los inmunocomplejos formados se detectaron mediante bioluminiscencia tal como se indicó. La cuantificación densitométrica de las señales se realizó mediante el programa de análisis *NIH image*.

12. Inmunoprecipitación.

Extractos de proteínas preparados en tampón RIPA como anteriormente (de aproximadamente 300 μ g) fueron incubados con 2.5 μ g del anticuerpo monoclonal específico

para NR1, con 0.5 μ l de anticuerpo policlonal para calnexina o con 0.5 μ g de anticuerpo policlonal para NR2A/B (C-ter), según se indica. Después de 1 h a 4° C, los inmunocomplejos se precipitaron con 100 μ l de Proteína A Sepharosa (Sigma Co., San Luis, MO) al 10% mediante incubación con agitación a esa misma temperatura durante 1 h. Las muestras se centrifugaron durante 1 min a 13.000 rpm y, una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento se lavó cuatro veces con tampón RIPA. Las proteínas en los complejos se solubilizaron en condiciones desnaturalizantes para su fraccionamiento en geles de acrilamida. El análisis de los resultados se realizó por autorradiografía, para las muestras marcadas radiactivamente, o por *immunoblot*.

13. Inmunofluorescencias.

Los cultivos primarios se crecieron sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina y L-laminina como se ha descrito previamente. Las células se fijaron durante 2 min en paraformaldehído al 4% en PBS a 4° C. El bloqueo se realizó mediante la incubación con HS al 10% en PBS a temperatura ambiente, durante 30 min. En los casos indicados, las células se permeabilizaron y bloquearon al mismo tiempo incubándolas en una solución de HS al 10% y Tritón X-100 al 0.1% en PBS durante 30 min. La dilución de los anticuerpos utilizados se hizo en HS 10% en PBS como se indicó anteriormente, y las incubaciones fueron de 1 h a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se montaron en solución de Fluoromount-G (SouthernBiotech). Las imágenes fueron entonces obtenidas mediante un microscopio confocal Radiante 2000 (BioRad) acoplado a un microscopio invertido Axiovert S100 TV (Zeiss) con distintos objetivos de inmersión.

14. Inmunohistoquímica.

La identificación del tejido infartado se realizó mediante tinción de secciones coronales de cerebro con Nissl (violeta cristal 0.1%), utilizando secciones adyacentes a estas para inmunohistoquímica. En primer lugar, estas fueron permeabilizadas y bloqueadas mediante su incubación durante 3 h a temperatura ambiente con suero de oveja al 10% y Tritón X-100 al 0.4% preparados en TBS. La dilución de los anticuerpos se realizó en suero de oveja al 4% y Triton X-100 al 0.2% en TBS, y las secciones se incubaron con los anticuerpos durante toda la noche a 4° C. Tras varios lavados en TBS, se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios. Después de lavar las secciones de nuevo, cuando se indica, se

incubaron con TO-PRO3 2 μ M (Molecular Probes) a temperatura ambiente durante 30 min, antes de montarlas en Fluoromount-G. Se prepararon secciones en paralelo como control sin anticuerpos primarios, para confirmar que los niveles de tinción inespecífica eran muy bajos. Finalmente, las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal como anteriormente.

15. *Northern blot.*

El RNA total fue preparado usando TriReagent (Sigma Co., St. Louis, MO) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 10 μ g de RNA total se fraccionaron en geles de agarosa al 1%, preparados en tampón MOPS 20 mM pH 7.2, formaldehído 0.6%. Una vez transferido el RNA a membranas de Nylon, se hibridó éste con sondas de DNA maracadas radiactivamente correspondientes a los nucleótidos 34 a 378 del cDNA de la β -actina de rata, o 344 a 1280 del cDNA de la isoforma NR1-1a. El marcaje de las sondas se realizó mediante procedimientos estándar.

16. Ensayo de protección frente a RNasas.

Las preparaciones de RNA total, obtenidas igual que anteriormente, fueron tratadas con DNasa I (10 unidades, Promega), libre de actividad RNasa, para eliminar cualquier posible contaminación con DNA genómico. A continuación, las muestras fueron extraídas con fenol-cloroformo y precipitadas antes de la cuantificación del RNA por espectrofotometría y comprobación de su integridad en geles de agarosa al 1%. Las ribosondas se prepararon por transcripción *in vitro* con las RNA polimerasas de T3 o T7 en presencia de [α - 32 P]CTP, utilizando el kit *MAXIscript In Vitro Transcription* (Ambion). La ribsonda de NR1 protege los nucleótidos 1250 al 1556 del cDNA de rata, y corresponde a los exones 7 a 9 presentes en todas las isoformas de NR1. Para el análisis de NR2 se usó una sonda que hibrida con los nucleótidos 2442 al 2683 del cDNA de la subunidad NR2A de rata. Como control de estos experimentos se utilizó una sonda que protegía los nucleótidos 196 al 357 del cDNA de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenada (GAPDH). El ensayo de protección frente a RNasas se realizó mediante el kit *RPAIL Ribonuclease Protection Assay* (Ambion). En cada ensayo RNA total extraído de los cultivos primarios o de la corteza cerebral (20 μ g) fue hibridado con las sondas específicas para NR1 o NR2, junto con la de GAPDH. Los fragmentos protegidos fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%,

que posteriormente se secaron y expusieron a películas de rayos-x a -70°C . La cuantificación de las señales obtenidas utilizando un *Instanalyzer* (Packard) y los valores obtenidos se normalizaron con respecto a los de GAPDH.

17. Ensayos de la actividad de promotores.

Los plásmidos pNRL5.4 (19-R1) y 356 (29) que contienen respectivamente secuencias de 5,4 kb y 356 pb del promotor de NR1 de rata acoplados al gen de la luciferasa de la luciérnaga, fueron generosamente cedidos por el Dr. Guang Bai (University of Maryland, USA). El plásmido pRL-SV40 (Promega) contiene el promotor temprano de SV40 controlando de forma constitutiva la expresión de la luciferasa de la *renilla* (Promega). Las neuronas de 12 DIVs se transfectaron con los plásmidos pNRL5.4 o 356 junto con pRL-SV40 como control de transfección, usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Los complejos de DNA/liposomas se prepararon en medio Neurobasal (Invitrogen) utilizando un exceso en moles de 5 a 1 de los plásmidos con promotores NR1 respecto a pRL-SV40. El medio de cultivo se cambió dos horas después de la adición de los complejos DNA/liposomas y la incubación de las células transfectadas continuó en medio condicionado. Después de 40 h de transfección se iniciaron los tratamientos indicados. Finalizados estos, se prepararon extractos proteicos en los que determinamos la actividad luciferasa mediante el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega). Los valores obtenidos en cada muestra para la actividad de la luciferasa de la luciérnaga fueron normalizados respecto a los correspondientes para la luciferasa de la *renilla*. En los experimentos controles se estimó una eficiencia de transfección de aproximadamente el 15 %.

18. Análisis cuantitativo por PCR en tiempo real.

La síntesis de cDNA se realizó mediante transcripción en reverso de RNA total (2 μg) obtenido de cultivos neuronales, utilizando hexanucleótidos degenerados y la transcriptasa inversa del virus Moloney de la leucemia murina MMLV (200 U) (Promega) en un volumen final de 20 μl , acorde con las instrucciones del fabricante. La reacción de qRT-PCR se realizó también en un volumen final de 20 μl conteniendo 0.5 μl de cDNA, Taq Polimerasa (Biotools) 0.05 U, dNTPs 0.2 mM, 0.2 μM de los oligonucleótidos específicos, 1:40000 de SybrGreen, y MgCl_2 3 mM. Las muestras se desnaturalizaron 2 min a 95°C , seguido de 35 ciclos consistentes en 20 segundos a 95°C , 20 segundos a 62°C y 30 segundos a 72°C . Como control

del experimento utilizamos oligonucleótidos que hibridaban con el cDNA de GAPDH: 5'-TTG CCA TCA ACG ACC CCT TC-3' y 5'-GCC TTG ACT GTG CCG TTG AA-3'. Los oligonucleótidos específicos para detectar los niveles de mRNA de NR1 son 5'-TCC ACC AAG AGC CCT TCG TG-3' (nucleótidos 1473 a 1493) y 5'-AGT TCA ACA ATC CGA AAA GCT GA-3' (nucleótidos 1541 a 1561). Amplifican una secuencia de 108 pb que es común para todas las isoformas de NR1. Los oligonucleótidos específicos para NR2A fueron 5'-ACG ACT GGG AC T ACA GCC TG-3' (nucleótidos 1250 a 1270) y 5'-CTT CTC TGC CTG CCC ATA GC-3' (nucleótidos 1344 a 1364), amplificando una secuencia de 134 pb del cDNA de NR2A. Los niveles de mRNA de NR1 fueron normalizados respecto a los de NR2A, acorde a la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$, tal y como se describe en el manual "qRT-PCR guide ABI Prism" (2004).

19. Marcaje metabólico de proteínas con ^{35}S -metionina.

Los cultivos de neuronas corticales se ayunaron durante 3h en medio DMEM sin metionina ni cisteína conteniendo DL-AP5, a una concentración de 200 μM . A continuación, se marcaron durante 4 h con 150 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -Metionina + cisteína. En los casos indicados, el NMDA y la glicina estuvieron presentes durante el marcaje. Posteriormente, las células marcadas se lavaron con tampón PBS a 4° C, y se lisaron en tampón RIPA como anteriormente. Mediante precipitación con ácido tricloroacético (TCA) se determinó la ^{35}S -metionina incorporada en las proteínas y se incubaron cuentas equivalentes con los anticuerpos correspondientes para inmunoprecipitar.

Resultados

RESULTADOS.

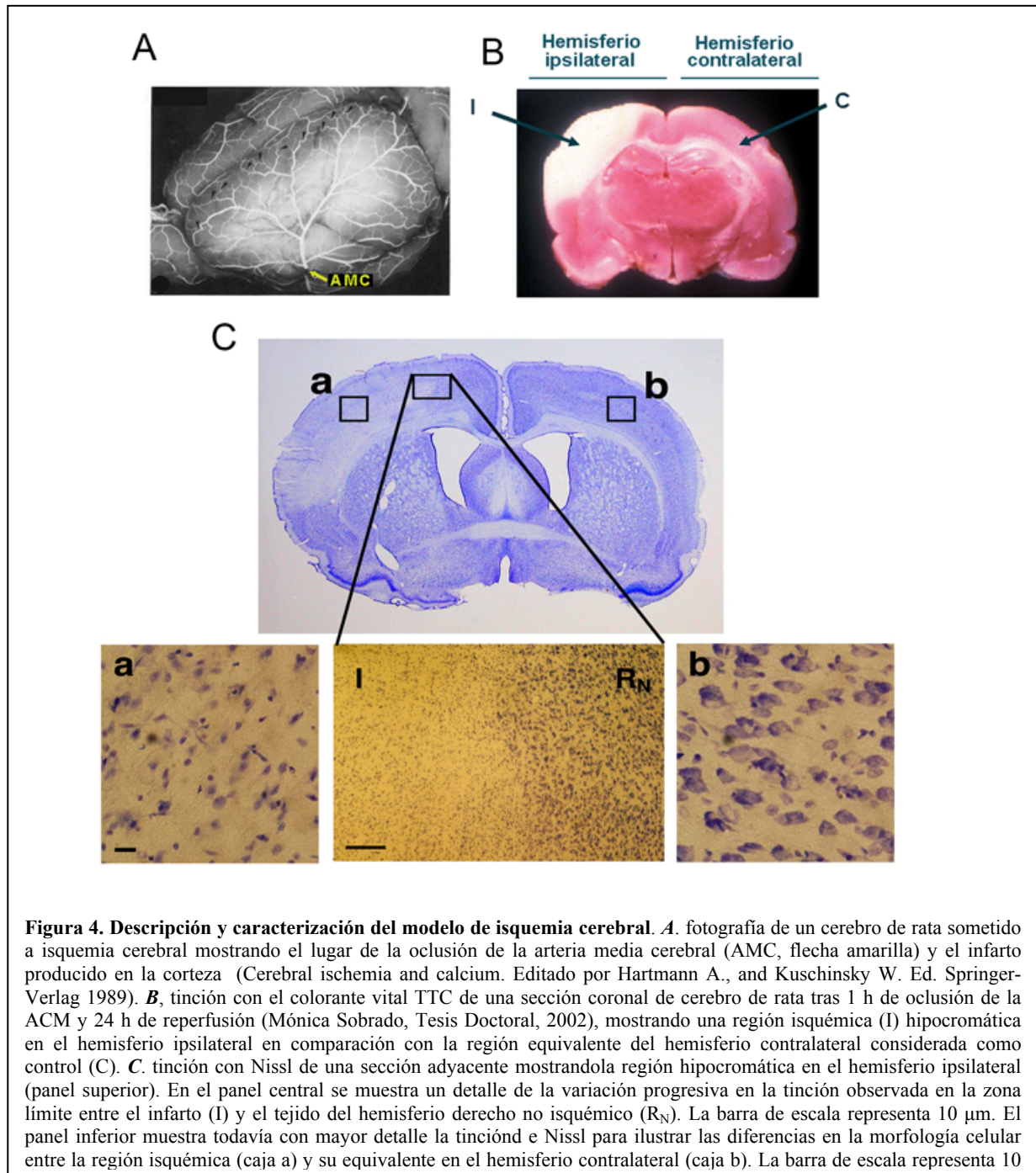
1. MODELOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS, EN LA CARACTERIZACIÓN DE LOS PROCESOS DE EXCITOTOXICIDAD E ISQUEMIA

Los resultados que se presentarán en esta tesis han sido obtenidos utilizando un modelo animal de isquemia cerebral, donde el proceso de excitotoxicidad tiene lugar *in vivo*, y un modelo celular, en el que la excitotoxicidad se induce *in vitro*.

1.2. Modelo animal de isquemia cerebral.

Hemos seleccionado un modelo de isquemia cerebral focal transitoria en rata que reproduce experimentalmente el tipo de infarto cerebral más frecuente en humanos. El método consiste básicamente en la oclusión temporal (1 h) de la arteria media cerebral (AMC) del hemisferio derecho (Fig. 4A) seguida por la perfusión sanguínea durante tiempos variables (1-24 h). Así se genera de forma reproducible, un infarto en el territorio de la AMC derecha, que puede visualizarse muy claramente mediante la tinción de las secciones coronales de cerebro con colorantes vitales. La figura 4 B muestra una de estas secciones, correspondientes a un animal sometido a 24 h de perfusión tras la oclusión, teñida con cloruro de trifeníl de tetrazolio (TTC). La región infartada puede verse claramente como una zona hipocromática en la corteza parietal y sensitivo-motora del hemisferio derecho. En los experimentos presentados en esta tesis se ha utilizado el tejido isquémico del hemisferio ipsilateral así como la región cortical equivalente en el hemisferio contralateral, usada como control interno. Como control adicional, se utilizan regiones equivalentes de la corteza cerebral de animales “sham-operated”, es decir, sometidos a todo el proceso quirúrgico a excepción de la oclusión de la AMC. Los cambios característicos que se producen en las células de cerebro por el proceso isquémico han sido confirmados mediante tinción de las secciones coronales con Nissl. En animales sometidos a 1 h de oclusión de la AMC y 24 h de perfusión se observa de nuevo un área hipocromática en la corteza del hemisferio ipsilateral, indicativa de daño neuronal. (Fig. 4C). El análisis en detalle de regiones equivalentes en el neocórtex de los hemisferios contralateral (Fig. 4C, caja b) e ipsilateral (Fig. 4C, caja a) muestra, además de la pérdida de tinción citoplásmica, cambios morfológicos importantes: las células de la región isquémica (Fig. 4C, panel a) muestran una apariencia triangular en comparación a la morfología redondeada de las células de la corteza contralateral

(Fig. 4C, panel b) y su tamaño es menor. También se observa en estas células, condensación nuclear.



1.3. Modelo celular de excitotoxicidad neuronal.

Para caracterizar el proceso de excitotoxicidad, nos hemos apoyado además en un modelo celular, más fácilmente manipulable que el modelo de ischemia cerebral. Con objeto de optimizar en lo posible el paralelismo entre los modelos *in vivo* e *in vitro* de excitotoxicidad, y

dado que en el modelo de isquemia el infarto tiene lugar en la corteza cerebral, hemos utilizado cultivos primarios de neuronas corticales de embrión de rata (E18) crecidos durante 14 días *in vitro* (DIVs) (Rose et al., 1993). Se trata de cultivos mixtos de neuronas maduras y células gliales, en los que bloqueamos el crecimiento de las células proliferativas mediante la adición, a 12 DIVs, de citosina- β -D-arabino-furanósido (AraC). Con el tiempo en cultivo, se observa un incremento progresivo en el número y la complejidad de las neuritas generadas por las neuronas (Fig 5A), indicativo del avance en el proceso de diferenciación celular. En cultivos maduros, se aprecia un entramado reticular muy complejo cubriendo la práctica totalidad del espacio intercelular (Fig. 5A, panel derecho). Para confirmar que los NMDARs son producidos eficientemente en los cultivos de 14 DIVs, se analizó mediante *immunoblot* la expresión de las subunidades del receptor en cultivos neuronales de distintos días *in vitro* (Fig. 5B). Las subunidades del receptor fueron detectadas utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce un dominio extracelular de NR1 (Fig. 5B, panel inferior), y un anticuerpo policlonal dirigido contra regiones conservadas en el extremo C-terminal de NR2A y NR2B (Fig. 5B, panel superior), las subunidades NR2 fundamentales en la corteza cerebral. Dado que estas subunidades tienen el mismo tamaño molecular, son indistinguibles en este experimento y las designaremos como NR2A/B. Los resultados muestran un aumento progresivo en la acumulación de las subunidades NR1 (Mr 116 kDa) y NR2A/B (Mr 180 kDa) del NMDAR, que pueden ser detectadas a partir del segundo día en cultivo y alcanzar niveles máximos a alrededor de los 14 DIVs.

El proceso de excitotoxicidad se mide en estos cultivos mediante la adición al medio del agonista NMDA (100 μ M) y su coagonista glicina (10 μ M), que estimulan tanto los NMDARs sinápticos como los extrasinápticos. En las células tratadas con NMDA y glicina puede observarse desde tiempos tempranos la degeneración de las neuritas y cambios morfológicos en los cuerpos celulares, que aumentan considerablemente de volumen y se hacen más redondeados (Fig. 4C, panel b). Las alteraciones celulares inducidas por los agonistas son bloqueadas en presencia de antagonistas específicos del NMDAR tales como DL-AP5, análogo del glutamato que funcionaría como un inhibidor competitivo (Fig 4C, panel c). Finalmente, para confirmar la inducción del proceso de excitotoxicidad, hemos caracterizado ensayos de viabilidad celular con MTT. Los resultados muestran una disminución progresiva en la viabilidad de las neuronas tratadas con NMDA (Fig. 4D), siendo esta reducción algo mayor del 60% tras 28 h de tratamiento.

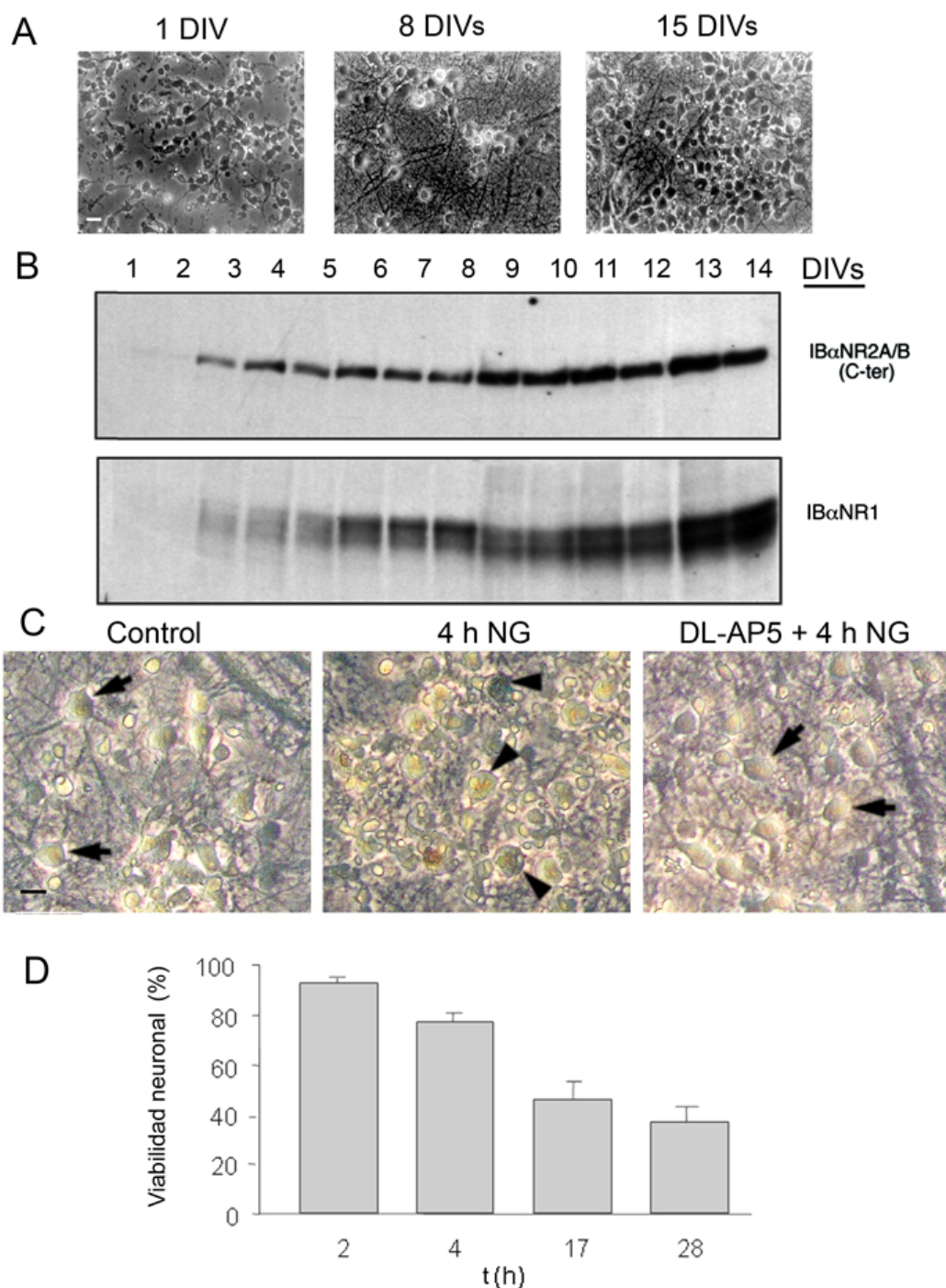


Figura 5. Descripción y caracterización del modelo de excitotoxicidad neuronal. *A*, microscopía de contraste de fases, de cultivos primarios de neuronas corticales de embriones de rata a distintos DIVs. La barra de escala representa 10 μ m. *B*, análisis por *immunoblot* de la expresión de las subunidades del NMDAR en cultivos primarios a distintos DIVs, utilizando un anticuerpo específico para NR1 (panel superior) o que reconoce secuencias conservadas en los extremos C-terminales de NR2A y NR2B (panel inferior). *C*, microscopía de contraste de fases mostrando la morfología de las neuronas de 14 DIVs sin tratar, en comparación con cultivos estimulados durante 4 h con los agonistas NMDA (100 μ M) y glicina (10 μ M), por sí solos, o en combinación con el antagonista DL-AP5 (200 μ M). Se muestran células con morfología neuronal típica (flechas negras) y células con morfología alterada por el tratamiento (cabezas de flecha). La barra de escala representa 10 μ m. *D*, estudio de la viabilidad neuronal mediante el ensayo del MTT, en cultivos neuronales (14 DIVs) tratados durante los tiempos indicados con NMDA y glicina. La contribución de las células gliales a las medidas fue sustraída tal como se indica en la sección de materiales y métodos, y los datos se presentan como valores relativos respecto a los resultados obtenidos en los cultivos sin tratar.

2. DESARROLLO DE VECTORES LENTIVIRALES, PARA LA EXPRESIÓN DE GENES RECOMBINANTES EN NEURONAS

En un proyecto en colaboración con los Drs. Scheifelle (Universidad de Columbia, Nueva York) y Gómez-Scholl (Universidad de Sevilla), hemos desarrollado lentivirus que permiten la expresión específica e inducible de proteínas en neuronas. Como se verá más adelante, utilizamos estos vectores para la expresión en neuronas de las subunidades NR2A y NR2B dotadas de secuencias marcadoras, que han permitido la caracterización inequívoca e independiente de la regulación de ambas proteínas en condiciones de excitotoxicidad. Adicionalmente, los vectores desarrollados en esta tesis están siendo utilizados en otros proyectos del laboratorio para investigar la contribución de otras proteínas (TrkB y caspasa-12) en la disyuntiva entre supervivencia y muerte neuronal.

2.1. Generación de vectores lentivirales que coexpresan dos proteínas recombinantes con especificidad neuronal.

En primer lugar nos propusimos generar un sistema de expresión viral bicistónico, con el que, a partir de un único virus, podríamos expresar dos genes diferentes al mismo tiempo y con especificidad neuronal. Teniendo en cuenta los problemas, previamente comentados, que derivan del uso de los elementos IRES, decidimos recurrir a la utilización de dos secuencias promotoras en el mismo vector. Para obtener especificidad neuronal, elegimos utilizar dos copias, de 0.5 kb cada una, de la parte proximal del promotor de la sinapsina I humana (SYN). Para asegurar la expresión eficiente de ambas unidades génicas decidimos incluir una copia de la secuencia WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional control element) detrás de cada una, lo que aumentará considerablemente la traducción de los mRNAs generados. Para caracterizar la eficiencia del sistema se utilizaron las secuencias que codifican para las proteínas DsRed y GFP tras el primer y segundo promotor de sinapsina, respectivamente, lo que dió lugar al vector SYN-DsRed-SYN-GFP. La región comprendida entre las secuencias LTR, que limitan la zona que serán encapsidadas en la partícula vírica, tiene un tamaño de aproximadamente 4800 kb, muy lejos del límite teórico (en torno a 10 kb) de los vectores lentivirales (Fig 6A).

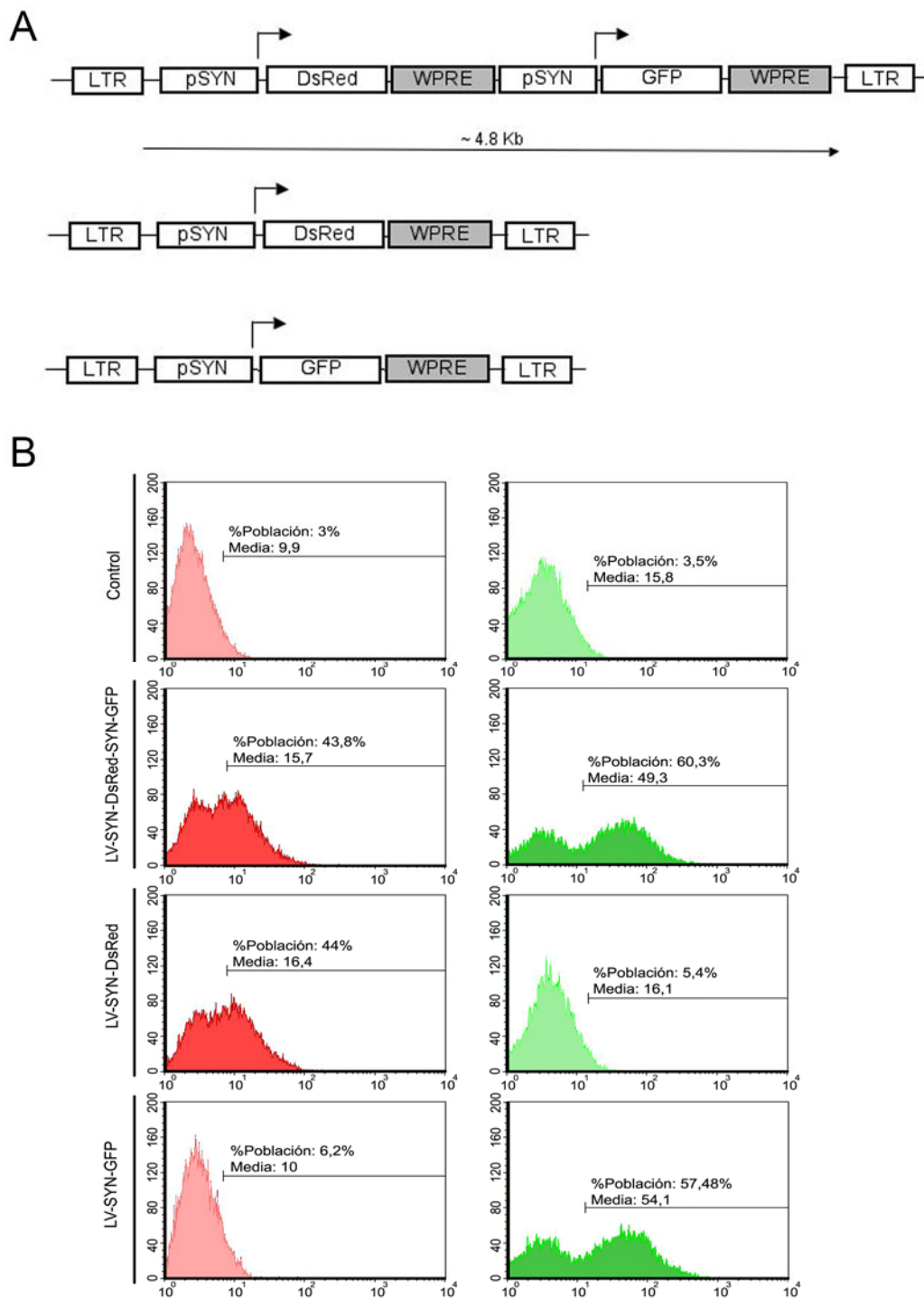


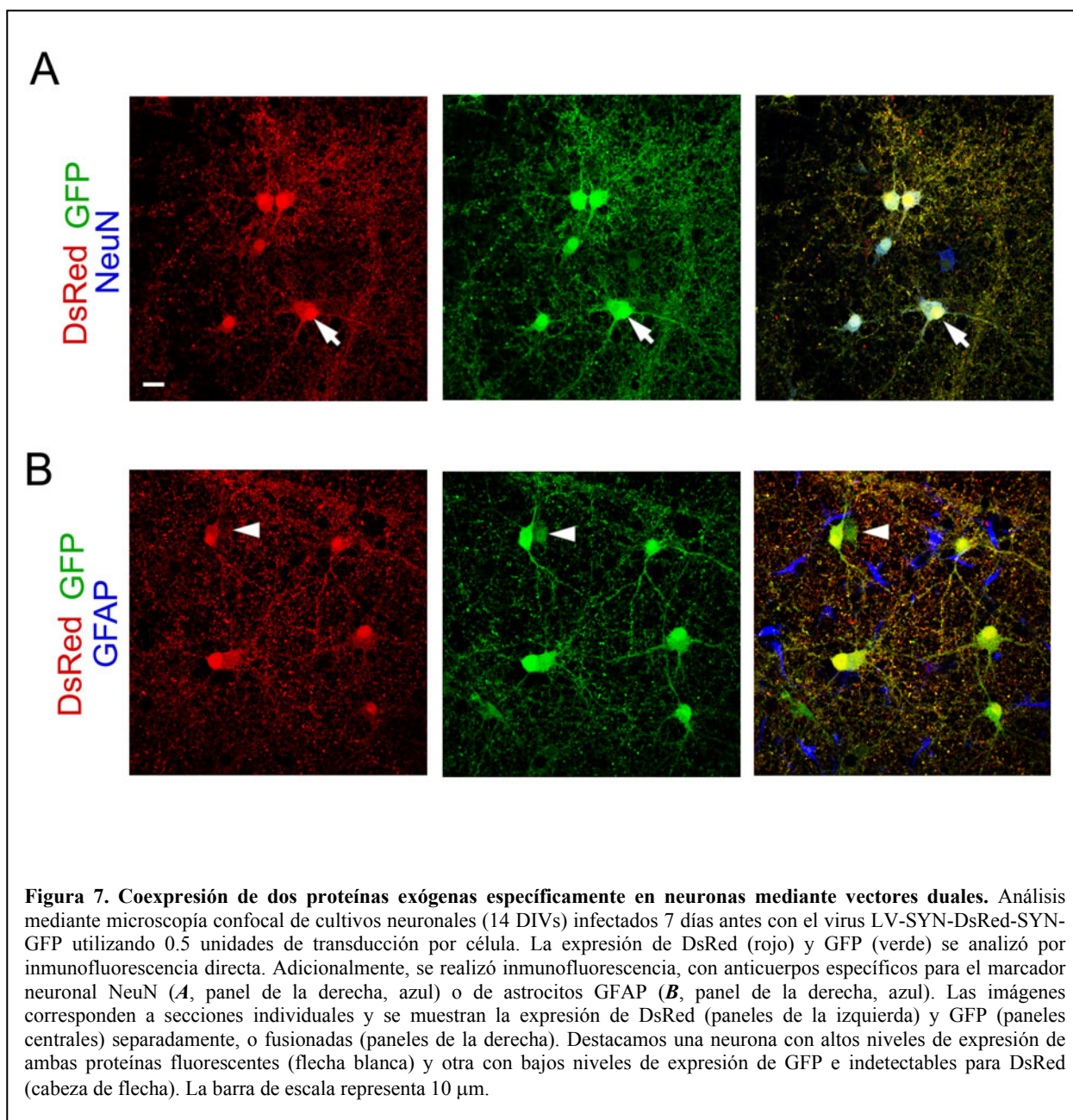
Figura 6. Esquema y funcionamiento de los vectores duales. *A*, esquema simplificado del vector de expresión dual *SYN-DsRed-SYN-GFP*. El vector contiene dos unidades génicas entre las regiones LTR, de 4.8 kb de tamaño total, formada cada una de ellas por el promotor de sinapsina y secuencias WPRE que favorecen la traducción de los mRNAs. La primera unidad dirige la expresión de DsRed, y la segunda la de GFP. También se muestran los vectores con una sola unidad génica para la expresión independiente de DsRed y GFP, respectivamente *SYN-DsRed* y *SYN-GFP*. *B*, cuantificación por FACScan de la expresión de las proteínas DsRed y GFP en los sistemas de expresión dual o únicos. Cultivos de células PC-12 fueron infectados con los virus *LV-SYN-DsRed-SYN-GFP*, *LV-SYN-DsRed* y *LV-SYN-GFP*, preparados a partir de los vectores anteriores, utilizando un título de 0.5 unidades de transducción por célula. Se muestra el resultado obtenido 72 h más tarde, en los canales rojo (paneles de la izquierda) y verde (paneles de la derecha). Como control se usaron células sin infectar (paneles superiores). Para el análisis de las poblaciones infectadas, se eligió una ventana de intensidad de fluorescencia que descartaba en las células control más del 96% de la población. En cada caso, se muestran los porcentajes de células infectadas y la media de la intensidad de fluorescencia.

En primer lugar quisimos comprobar si la actividad del primer promotor de SYN pudiera afectar a la transcripción del segundo. Para ello infectamos células PC12 con el virus dual LV-SYN-DsRed-SYN-GFP (0.5 TUs/célula) y, 72 h después, analizamos la expresión de ambas unidades génicas mediante FACScan, donde las proteínas DsRed y GFP fueron detectadas en los canales rojo y verde, respectivamente. Posteriormente se compararon los datos con el resultado obtenido en cultivos paralelos que fueron infectados, por separado, con los virus monopromotor LV-SYN-DsRed y LV-SYN-GFP, expresando las proteínas DsRed y GFP, respectivamente. En la figura 1B se representan las distribuciones de las poblaciones celulares con respecto a las intensidades de expresión de cada proteína fluorescente, con el canal rojo (izquierda) y el verde (derecha) por separado, en células sin infectar o infectadas con los lentivirus LV-SYN-DsRed-SYN-GFP, LV-SYN-DsRed y LV-SYN-GFP. Si estudiamos la expresión de la proteína DsRed, que está situada bajo el control del primer promotor de SYN (Fig. 6A y B, paneles de la izquierda) puede observarse que no hay diferencias significativas entre la media geométrica obtenida para el sistema dual (15,7) y el sistema monopromotor (16,39). Por otra parte, cuando analizamos la expresión de GFP, que está situado bajo el control del segundo promotor de SYN (Fig. 6A y C, paneles de la derecha), observamos que la media geométrica (49,3) es tan solo ligeramente inferior a la obtenida con el sistema monopromotor (54, 1). En conclusión estos resultados demuestran que la inserción de dos genes diferentes en el mismo vector lentiviral, no interfieren mutuamente en su expresión, cuando se utilizan dos promotores SYN con especificidad neuronal.

2.2. Caracterización de la expresión del sistema dual en neuronas.

La expresión de proteínas recombinantes, mediante el uso del promotor SYN y secuencias WPRE, ya ha sido probada previamente en sistemas neuronales, mediante vectores adenovirus, con buenos resultados en cuanto a eficiencia y especificidad (Glover et al., 2002). No obstante, una vez caracterizado el rendimiento de nuestro lentivirus dual en las células PC-12, queríamos confirmar que este es igualmente eficiente en cultivos de neuronas, donde podríamos, adicionalmente, analizar su especificidad. Para ello se crecieron cultivos primarios de neuronas corticales (7 DIVs) que fueron incubados con el lentivirus LV-SYN-DsRed-SYN-GFP, a 0.5 UT/célula, para favorecer la transducción de una sólo copia del vector lentiviral en cada célula. La expresión de las proteínas fluorescentes se analizó por fluorescencia directa en microscopio confocal 7 días después de la infección (14 DIVs) (Fig. 7). Dado que estos cultivos primarios contienen neuronas y células de glía, mayoritariamente astrocitos, utilizamos anticuerpos

específicos que reconocen las proteínas NeuN y GFAP, como marcadores de células neuronales y astrocitos, respectivamente. En los resultados de las inmunofluorescencias se observa la expresión de DsRed en las neuritas y los cuerpos de las neuronas (Figs. 7A y B). Además, todas las células expresando niveles elevados de DsRed, también expresaron niveles comparables de GFP (Fig. 7A, obsérvense las flechas blancas), lo que sugiere que ambos genes son expresados eficientemente.



Por otra parte, los anticuerpos específicos para los marcadores NeuN y GFAP muestran que todas las células que expresaron proteínas fluorescentes, ya sea DsRed o GFP, fueron neuronas (Fig. 7A), no pudiéndose detectar en astrocitos (Fig. 7B). Para confirmar que la actividad de ambos genes es equivalente se realizó una cuantificación del número de células que, expresando DsRed, también expresaban GFP, y viceversa. El resultado de esta cuantificación (datos no mostrados) determinó que todas las neuronas que expresaron DsRed, también fueron positivas para GFP. No obstante, un 12% de las células positivas para GFP no mostraron niveles detectables de la proteína DsRed. Es muy posible que esto se deba a que la proteína DsRed es más difícil de detectar, por fluorescencia directa, que la proteína GFP, dado que únicamente algunas células con muy bajos niveles de GFP fueron negativas para DsRed (Fig. 7, cabezas de flecha). Los resultados previos obtenidos por FACS, mostrando una menor detección de la proteína DsRed que de GFP en células PC-12, apoyan esta hipótesis (Fig. 6B). En conjunto, estos resultados demuestran una coexpresión eficiente y específica en neuronas, de los dos genes controlados por el promotor SYN en nuestro sistema lentiviral de expresión dual.

2.3. El sistema de expresión dual como base para la expresión de genes regulados en neuronas.

El sistema de la tetraciclina (Tet) es uno de los más utilizados en la expresión regulada de genes exógenos (Zhu et al., 2002), y en su versión “Tet-off”, el transactivador rTA activa la transcripción del gen situado bajo el control del promotor TTA. En este caso la actividad del promotor es regulada negativamente por la presencia de la doxociclina (DOX), un análogo de la tetraciclina, que se une al transactivador bloqueándolo. Esto requiere de la presencia del transactivador en la misma célula donde se encuentra el gen controlado por el promotor inducible. Nosotros hemos generado el plásmido SYN-Tetoff-GFP que contiene, en un único vector lentiviral, todos los elementos necesarios para la expresión regulable por DOX (Fig. 8A). Para ello se sustituyó en el vector SYN-DsRed-SYN-GFP (Fig. 6A), el gen de la proteína DsRed por otro que codifica para el transactivador tTA. A continuación se sustituyó el segundo promotor de SYN por el promotor inducible TRE, dando lugar a dicho vector regulable, que además presenta expresión específica neuronal. A partir de este, se generó el vector SV40-Tetoff-GFP, también regulable, pero con el promotor ubicuo SV40, y por tanto, sin especificidad neuronal.

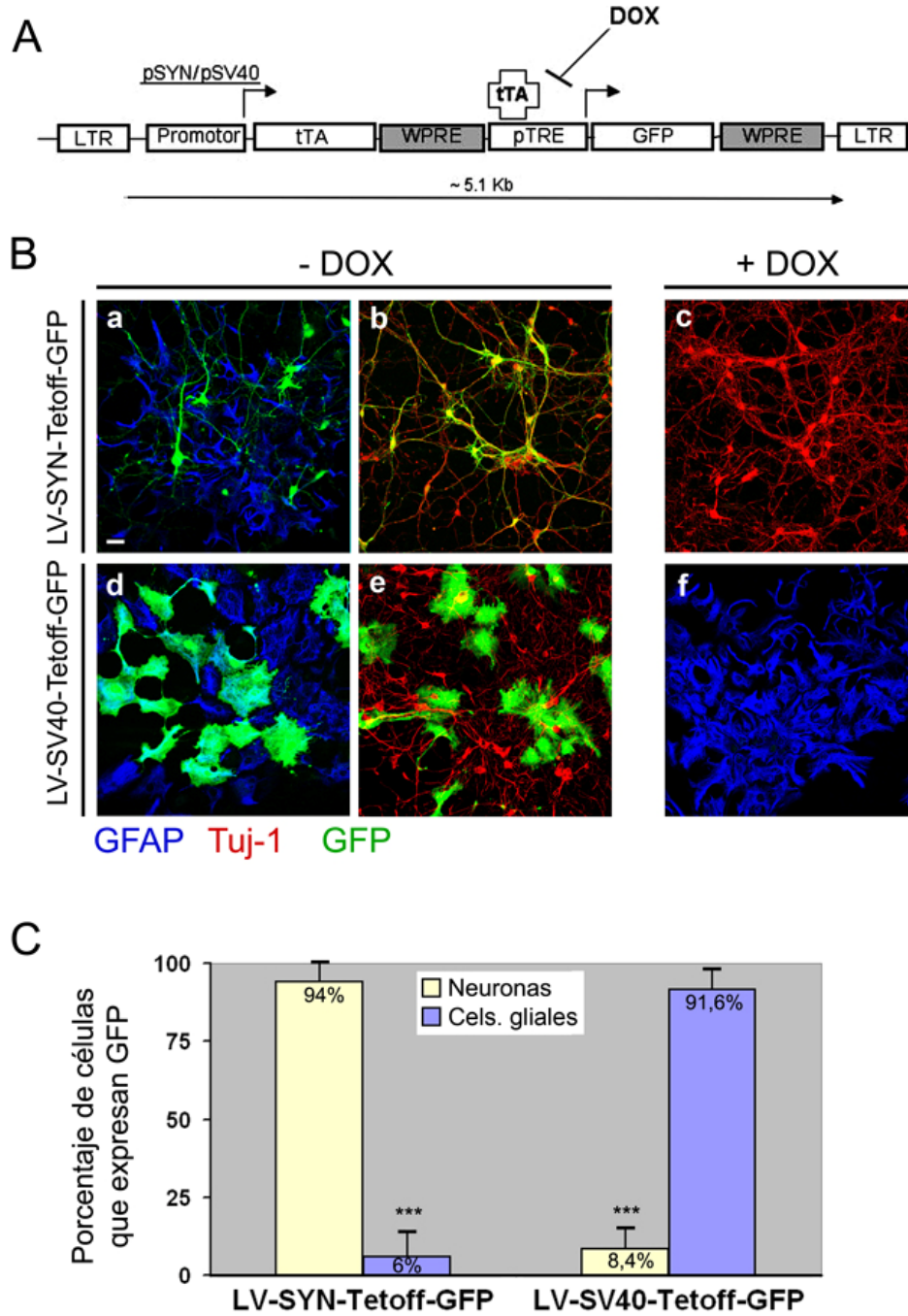


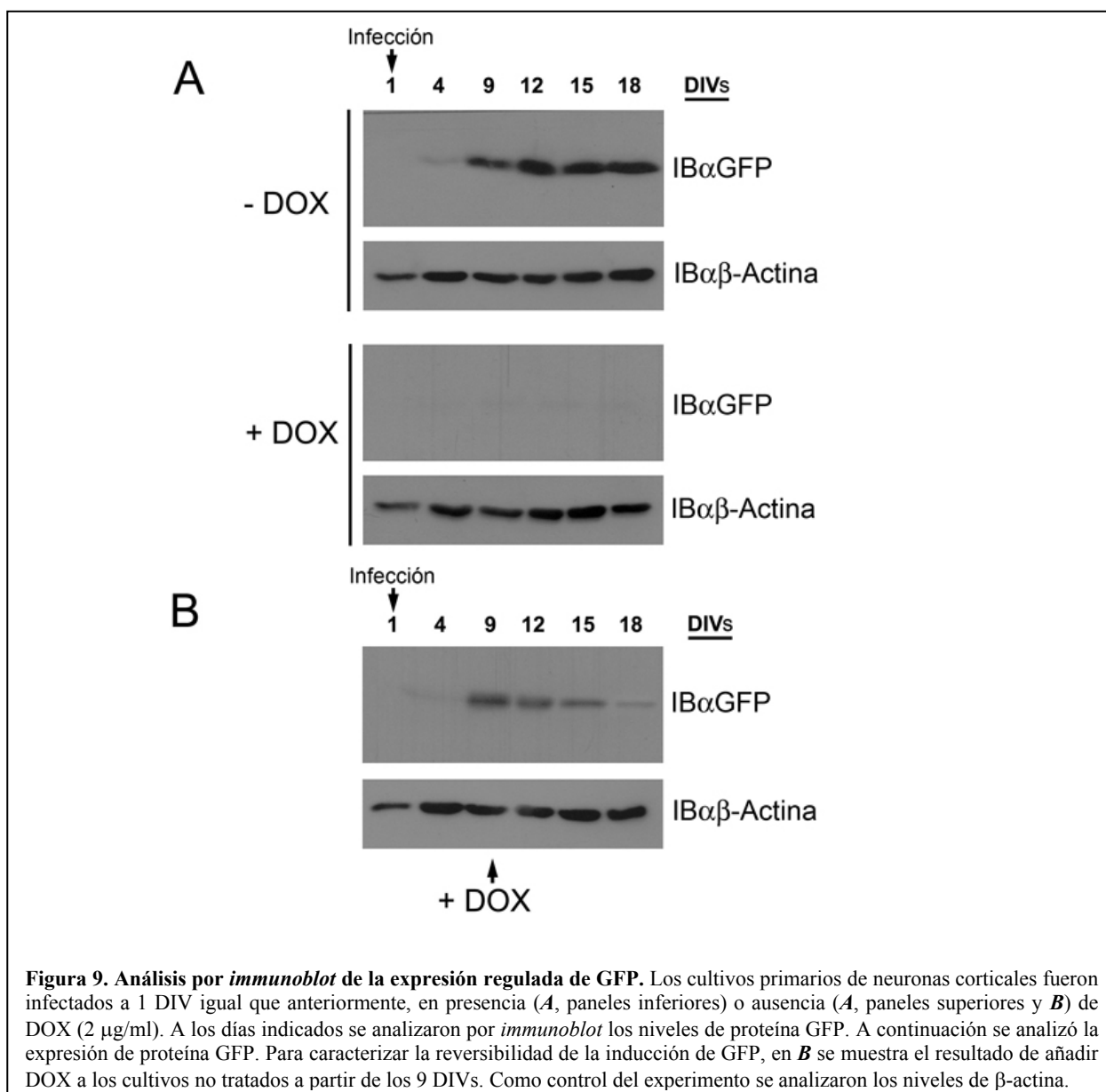
Fig. 8. Expresión regulada en neuronas usando vectores lentivirales. **A**, esquema de los vectores regulables SYN-Tetoff-GFP/SV40-Tetoff-GFP, donde la expresión del transactivador tTA está controlada por el primer promotor, que puede ser o no específico (sinapsina/SV40). En segundo lugar, el promotor TRE, es activado por tTA, y permite la expresión de GFP. Cuando la DOX está presente en el medio, el transactivador tTA queda bloqueado y por tanto se inhibe la actividad del promotor TRE, y la expresión de GFP. **B**, imágenes obtenidas mediante microscopía confocal a partir de cultivos primarios de neuronas corticales, infectados a 1 DIV con los virus LV-SYN-Tetoff-GFP (paneles a, b y c) o LV-SV40-Tetoff-GFP (paneles d, e y f), y que crecieron durante 7 días más en ausencia o presencia de DOX (2 µg/ml, renovado cada 72 horas) cuando se indica. La expresión de GFP se analizó por fluorescencia directa (verde), mientras que la especificidad del sistema se determinó mediante la utilización del marcador neuronal Tuj-1 (rojo, paneles b y c) o el marcador de astrocitos GFAP (azul, paneles d y f). La barra de escala corresponde a 10 µm. **B**, resultado de la cuantificación a partir de fotografías obtenidas por el procedimiento anterior. Se representa el porcentaje de células infectadas que se clasificaron como neuronas (positivas para Tuj-1) o como glía (positivas para GFAP), con respecto al total. Para el análisis se contaron 11 campos aleatorios del microscopio obtenidos de 3 experimentos independientes. En la gráfica se representa la media ± D.E y también se muestra el valor numérico obtenido en cada caso. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada. ***, $p < 0.001$.

Para estudiar la especificidad y eficiencia del vector regulable SYN-Tetoff-GFP, las neuronas corticales, cultivadas durante tan sólo 24 h en ausencia o presencia de DOX, fueron transducidas y analizadas, 7 días después (8 DIVs), por inmunofluorescencia directa. Para determinar la especificidad del promotor de SYN en el sistema regulable se utilizaron los marcadores Tuj1 (Fig. 8B, paneles b y c) y GFAP (Fig. 8B, panel a) para las neuronas y los astrocitos respectivamente. La expresión de GFP fue detectada claramente en las neuronas crecidas en ausencia de DOX (Fig. 8B, paneles a y b). Por el contrario no pudo detectarse expresión de GFP en los cultivos tratados con DOX (Fig. 8B, panel c). Paralelamente se caracterizó, de la misma forma, la expresión del vector regulable sin especificidad neuronal SV40-Tetoff-GFP. En cultivos crecidos en ausencia de DOX se observa que, en este caso, la expresión de GFP se detecta fundamentalmente en astrocitos (Fig. 8B, panel d) y no en neuronas (Fig. 8B, panel e). Igualmente no pudo detectarse ninguna expresión de GFP en los cultivos tratados con DOX (Fig. 8B, panel f). Para caracterizar con mayor precisión la especificidad de ambas construcciones se cuantificaron, para cada construcción regulable, 11 campos de tres experimentos independientes, y se determinó el porcentaje de expresión de GFP en neuronas y astrocitos (Fig. 8C). Así se confirmó que, bajo nuestras condiciones de trabajo, con el virus LV-SYN-Tetoff-GFP un 94 % de las células positivas para GFP, fueron neuronas, frente a tan solo un 6 % correspondientes a los astrocitos. Contrariamente, con el virus LV-SV40-Tetoff-GFP obtuvimos un 91.6 % de células positivas pertenecientes a la estirpe neuronal, frente a un 8.4 % de astrocitos. En ninguno de los casos se detectaron células positivas cuando los cultivos crecieron en presencia de DOX. En conclusión, estos datos demuestran que la expresión del sistema regulable SYN-Tetoff-GFP presenta especificidad neuronal y es eficientemente bloqueada por la presencia de DOX.

2.4. Caracterización de la cinética activación y bloqueo transcripcional en el sistema regulable con especificidad neuronal.

Para analizar la cinética de la expresión del sistema regulable, las neuronas corticales crecidas durante 24 h, igual que anteriormente, fueron incubadas con el lentivirus LV-SYN-Tetoff-GFP en presencia o ausencia de DOX y durante los tiempos indicados. El resultado se analizó por *immunoblot* utilizando un anticuerpo policlonal específico para esta proteína fluorescente (Fig. 9A), y al mismo tiempo, como control de carga, se utilizó un segundo anticuerpo monoclonal dirigido contra la β -actina. Cuando las neuronas crecieron en ausencia de DOX, la proteína GFP detectada fue acumulándose con el tiempo en cultivo, llegando a un

máximo de expresión aproximadamente tras 9 días después de la infección, y estos niveles se mantuvieron estables durante 9 días más que duró el experimento (Fig. 9A, paneles superiores). En todo momento la expresión de GFP en los cultivos tratados con DOX fue indetectable (Fig. 9A, paneles intermedios).



En muchos casos es importante que un sistema de expresión pueda ser bloqueado después de haber estado previamente activo. Para analizar si esto es posible con nuestro sistema neuroespecífico, se realizó un experimento semejante a los anteriores, en el que las neuronas transducidas a DIV1 crecieron durante 9 días sin tratamiento. A partir de este momento se empezaron a tratar con DOX hasta el final del experimento, que concluyó otros 9 días después. Posteriormente se estudió la expresión de GFP mediante *immunoblot* igual que anteriormente

(Fig. 9B). El resultado del *immunoblot* muestra que tras la adición de DOX, la expresión de GFP fue reduciéndose progresivamente con el tiempo en cultivo. En conclusión, los datos aquí presentados demuestran que el vector lentiviral LV-SYN-Tetoff-GFP presenta especificidad neuronal y que puede ser regulado muy eficientemente en cultivos de neuronas corticales.

3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL NMDAR EN EXCITOTOXICIDAD E ISQUEMIA.

3.1. Regulación del NMDAR y de PSD-95 en la isquemia cerebral.

Una posible explicación del fracaso en el tratamiento de la isquemia cerebral con antagonistas competitivos del NMDAR (Ikonomidou and Turski, 2002) era que la función de este receptor estuviese regulada negativamente por su estimulación en condiciones de excitotoxicidad. Para poner a prueba esta hipótesis, en primer lugar se compararon regiones equivalentes en el neocortex de los hemisferios contralateral e ipsilateral de animales sometidos a 1 h de oclusión de la AMC y 24 h de perfusión mediante inmunohistoquímica de secciones coronales. Analizamos la posible regulación de las subunidades del NMDAR utilizando anticuerpos policlonales que reconocen el dominio intracelular C1 de NR1 (Fig. 10, paneles a y b), o dirigidos contra regiones conservadas en el extremo C-terminal de NR2A y NR2B (Fig. 10, paneles c y d). Al mismo tiempo, en ambos casos se utilizaron anticuerpos monoclonales para NeuN, un marcador específico de neuronas post-mitóticas. Observamos un patrón de expresión muy similar para NR1, NR2A y NR2B en las neuronas de la corteza del hemisferio contralateral, con inmunoreactividad muy intensa en el soma o cuerpo neuronal y en *clusters* en las dendritas (Fig. 10., paneles b y d). Por el contrario, la expresión de las tres subunidades se redujo dramáticamente en la región isquémica (paneles a y c, respectivamente) mientras que los niveles de NeuN se mantuvieron estables, demostrando que la disminución en NR1, NR2A y NR2B era específica y no un efecto general del proceso isquémico. La regulación de NR2B ya había sido demostrada previamente en un modelo diferente de isquemia, tratándose en este caso de una oclusión global (Simpkins et al., 2003). Sin embargo, no existían datos sobre la regulación de NR2A en isquemia y, dado el papel central de dicha subunidad en la transmisión sináptica y en la supervivencia neuronal, era fundamental analizar este aspecto de forma directa e inequívoca. Para ello, utilizamos un anticuerpo específico dirigido contra una región del su extremo C-terminal de NR2A (Fig. 10, paneles e y f). Los resultados demuestran claramente la

regulación de la subunidad NR2A del NMDAR, junto a NR1 y NR2B, asociada al proceso de isquemia cerebral focal transitoria.

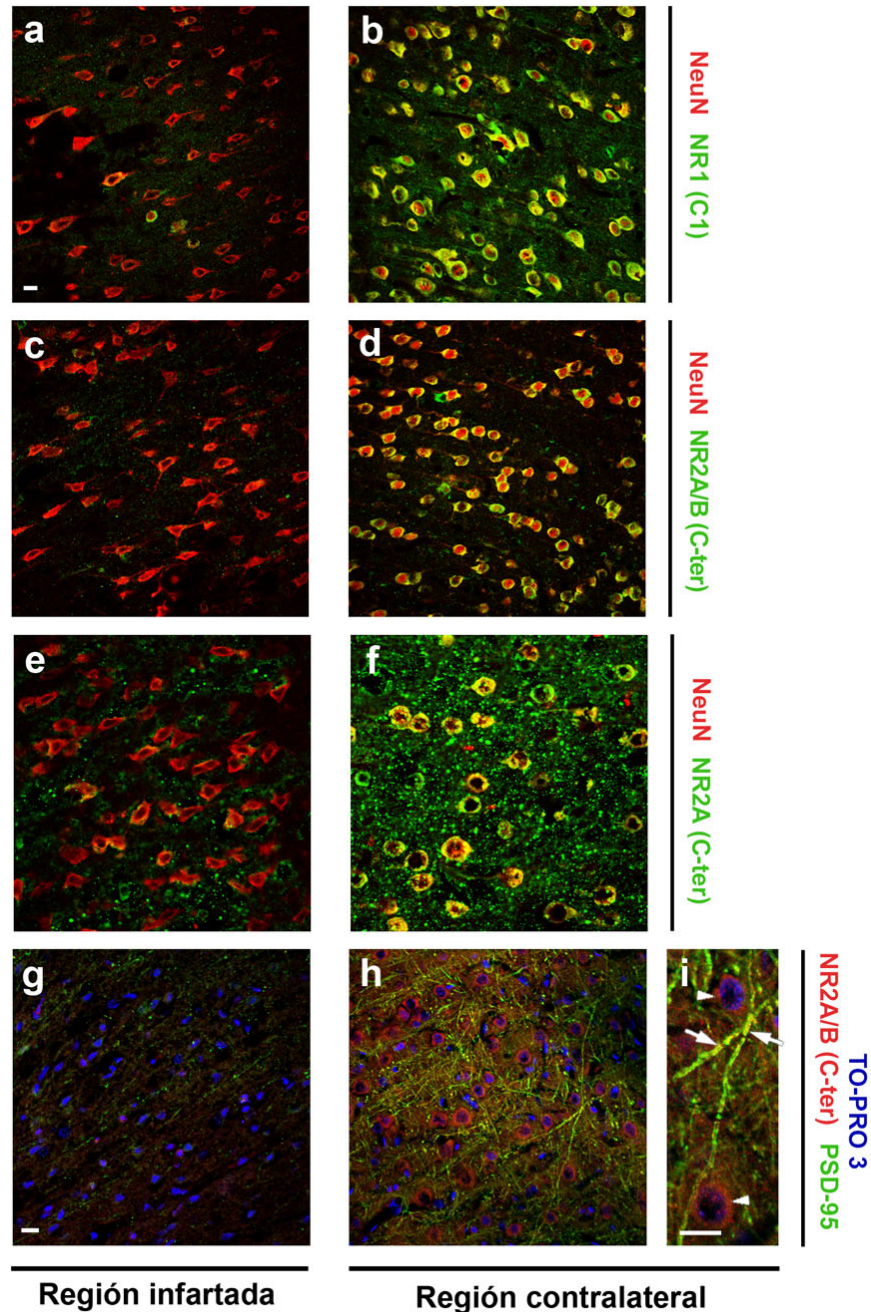


Fig 10. Regulación específica de las subunidades del NMDAR y PSD95 en isquemia cerebral. Análisis inmunoistoquímico de secciones coronales de animales sometidos a oclusión de la AMC y reperfundidos durante 24 h, comparando regiones del área infartada en el hemisferio ipsilateral (paneles de la izquierda) y sus equivalentes en el hemisferio contralateral (paneles de la derecha). La expresión de NeuN se representa en rojo (paneles a-f), mientras que en verde se muestra alternativamente la expresión de NR1 (paneles a y b), NR2A/B (paneles c y d) o NR2A (paneles e y f). Los paneles g y h muestran los resultados para PSD95 (rojo), NR2A/B (verde) y la tinción nuclear mediante TO-PRO 3 (azul). El panel i muestra un detalle de la expresión de NR2A/B en el cuerpo de las neuronas de la región contralateral (cabezas de flecha), y de su colocalización con PSD-95 en la membrana de las neuritas (flechas). Las imágenes son secciones únicas tomadas por microscopía confocal, y la barra de escala representa 10 μ m.

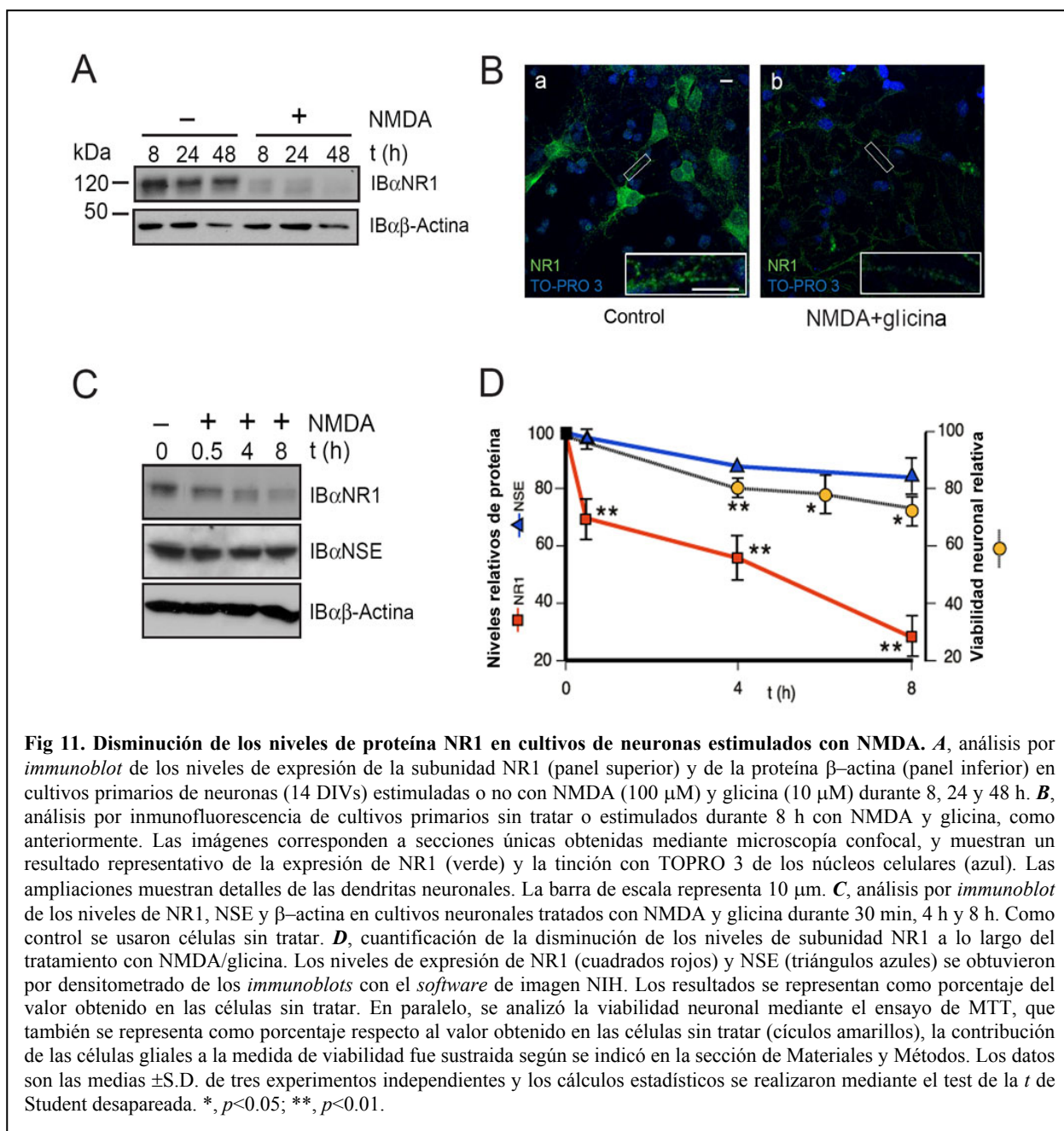
En este experimento también se caracterizó la estabilidad de PSD-95 durante la isquemia cerebral. Esta proteína, fundamental en la densidad postsináptica, interacciona con los dominios C-terminales de las subunidades NR2 y algunas isoformas de NR1 (Kornau et al., 1995), y se ha sugerido que podría proteger a NR2A de la proteólisis dependiente de calpaína en neuronas maduras (Dong et al., 2004). Se realizó inmunohistoquímica con el anticuerpo para NR2A/B anterior y un anticuerpo monoclonal que reconoce a PSD-95. Los resultados mostraron numerosas neuritas en el hemisferio contralateral que expresaban PSD-95 (Fig 10., panel h), y la colocalización parcial con las subunidades NR2A/B en la membrana celular (Fig. 10, panel i). Por otra parte, se observó claramente una reducción muy significativa en los niveles de PSD-95 en la región infartada, en paralelo a la disminución de las subunidades NR2A/B (Fig 10, panel g). En conjunto, estos resultados demuestran una disminución dramática y específica en la expresión de las subunidades del NMDAR NR1, NR2A y NR2B y, al mismo tiempo, de la proteína PSD-95, que es inducida en las neuronas adultas de la corteza cerebral por el proceso de isquemia.

3.2. Regulación de la expresión de la subunidad NR1 en un modelo celular de excitotoxicidad.

En primer lugar, hemos caracterizado el mecanismo de regulación negativa de la subunidad NR1 inducido en condiciones de excitotoxicidad, utilizando un modelo celular en el que este proceso tiene lugar *in vitro*. Para ello, cultivos primarios de neuronas corticales de rata (14 DIVs), fueron incubados con los coagonistas NMDA (100 μ M) y glicina (10 μ M) durante los tiempos indicados. Los niveles de expresión de NR1 se determinaron por inmunodetección de la proteína transferida a filtros de nitrocelulosa, utilizando el anticuerpo dirigido contra un dominio extracelular de esta proteína (Fig. 11A). En comparación con las células sin tratar, observamos una disminución dramática en los niveles de NR1 en los cultivos tratados 8 h con los agonistas. Esta disminución se acentuó para tiempos de tratamiento más largos, llegando los niveles de NR1 a ser prácticamente indetectables tras 48 h. Por el contrario, el tratamiento con NMDA no tuvo un efecto significativo en los niveles de expresión de β -actina en los tiempos estudiados.

El análisis mediante inmunofluorescencia de los cultivos primarios permitió confirmar los resultados anteriores (Fig. 11B). En células sin tratar (Fig. 11B, panel a) se observa la tinción característica para NR1 en el cuerpo celular y formando un punteado sobre las dendritas (ver ampliación). La tinción de los núcleos con TO-PRO 3 reveló la presencia de células gliales en

los cultivos primarios, en las que no se detectaba expresión de NR1. La estimulación de estos cultivos con NMDA y glicina durante 8 h indujo una disminución muy marcada en la intensidad de la tinción específica para NR1 (Fig. 11B, panel b), tanto en el cuerpo celular como en las dendritas.



Para excluir la posibilidad de que la disminución en los niveles de NR1 fuera una consecuencia inespecífica de la muerte neuronal, se realizó un estudio a tiempos de exposición a NMDA más cortos en el que analizamos la expresión de esta subunidad junto a otra proteína, la enolasa específica neuronal (NSE), así como la viabilidad celular. De esta forma, realizamos inmunodetección de NR1 en extractos de neuronas tratadas con NMDA desde 30 min hasta 8 h

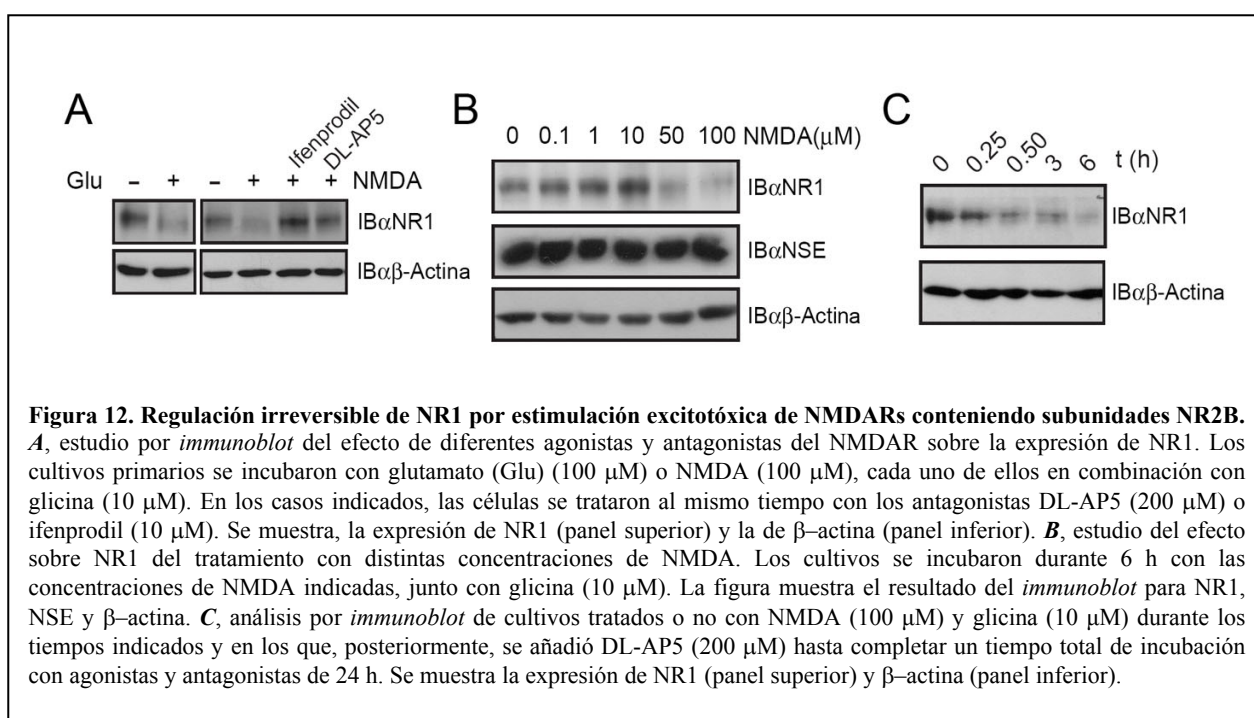
(Fig. 11C) y cuantificamos los resultados de tres experimentos independientes (Fig. 11D). Treinta minutos de estimulación con NMDA fueron suficientes para reducir los niveles de NR1 en un 29%, comparados con los de células sin tratar ($p<0.01$). Tras 4 y 8 h de tratamiento, los niveles de esta subunidad fueron, respectivamente, un 43 y un 71% inferiores a los obtenidos en las células control ($p<0.01$). Sin embargo, el ensayo de viabilidad celular mostró una disminución de tan solo el 25% en la viabilidad de las neuronas tras 8 h de tratamiento con NMDA (Fig. 11D). No obstante, como se comentó previamente, estas neuronas están destinadas a morir, tal como se confirma utilizando tiempos más largos de tratamiento (Fig. 5D). De acuerdo con los resultados anteriores, la expresión de la proteína NSE en estos cultivos presentó una cinética de disminución lenta, muy similar a la observada en la viabilidad celular. Los niveles de expresión de β -actina no se vieron afectados por el tratamiento. En conjunto, todos estos datos confirman que la regulación de la expresión de NR1 como resultado de la activación del NMDAR es un proceso específico, y no forma parte de efectos inespecíficos derivados de la muerte neuronal por excitotoxicidad.

3.3. Requerimientos de la estimulación del NMDAR para la regulación de NR1.

Para investigar las condiciones que se requieren para la autorregulación de la subunidad NR1 en excitotoxicidad, decidimos estudiar en primer lugar el efecto de diferentes agonistas y antagonistas del NMDAR (Fig. 12A). El glutamato regula la expresión de NR1 de forma similar a lo previamente observado con el agonista NMDA y, por otra parte, el antagonista específico del NMDAR DL-AP5 previene dicha regulación. Estas observaciones confirman que la regulación de NR1 inducida por los agonistas de los receptores de glutamato está mediada por la activación directa del NMDAR. Adicionalmente, la regulación de NR1 inducida por NMDA también fue prevenida por ifenprodil (12 μ M), un inhibidor selectivo de las subunidades NR2B (Williams, 1993). Dado que las neuronas a este tiempo en cultivo (14 DIV) expresan ambas subunidades NR2 puede concluirse que el mecanismo de regulación de NR1 requiere de la activación de NMDARs que contengan subunidades NR2B en su estructura.

Los niveles de proteína NR1 en las neuronas tratadas sólo con los antagonistas DL-AP5 o ifenprodil no fueron significativamente modificados en comparación con los de las células sin tratar (datos no mostrados), sugiriendo que la actividad basal de los NMDARs en los cultivos utilizados, por sí misma, no induce el proceso de regulación de esta subunidad. Para analizar directamente las concentraciones de NMDA requeridas para regular NR1, estudiamos los niveles

de esta proteína en neuronas corticales incubadas con diferentes concentraciones de NMDA (0.1-100 μ M) durante 6 h (Fig. 12B). La regulación de NR1 se observó solo para concentraciones de NMDA mayores a 10 μ M, sugiriendo que el mecanismo responsable requiere de una estimulación del NMDAR en condiciones de excitotoxicidad. Este tipo de respuesta no lineal a las distintas concentraciones de NMDA ha sido descrita previamente para el daño neuronal inducido por tratamientos largos con agonista (Koh and Choi, 1988). De acuerdo con los resultados anteriores, hemos demostrado también que la estimulación crónica pero no excitotóxica del NMDAR no afecta a la expresión de NR1 en neuronas corticales. Para incrementar la actividad del NMDAR, las neuronas corticales fueron tratadas durante 48 h con bicuculina (40 μ M), un antagonista de los receptores del ácido γ -aminobutírico (GABA) tipo A, que actúan fisiológicamente como receptores inhibitorios de las sinapsis. Tal como había sido mostrado previamente en células de hipocampo (Mu et al., 2003), este tratamiento no modificó la expresión de la proteína NR1 en las neuronas corticales.



Por otra parte hemos analizado si la disminución en los niveles de NR1 inducida en condiciones de excitotoxicidad puede ser bloqueada por el tratamiento con antagonistas del receptor o bien si el proceso, una vez iniciado, es irreversible (Fig. 12C). En neuronas tratadas tan sólo 15 min con NMDA, previamente al bloqueo de los receptores con DL-AP5, los niveles de proteína NR1 detectados 24 h después disminuyeron un 25%, con respecto a los de las células sin tratar. Cuando la exposición a NMDA fue de 30 min, se observó una disminución en NR1 del

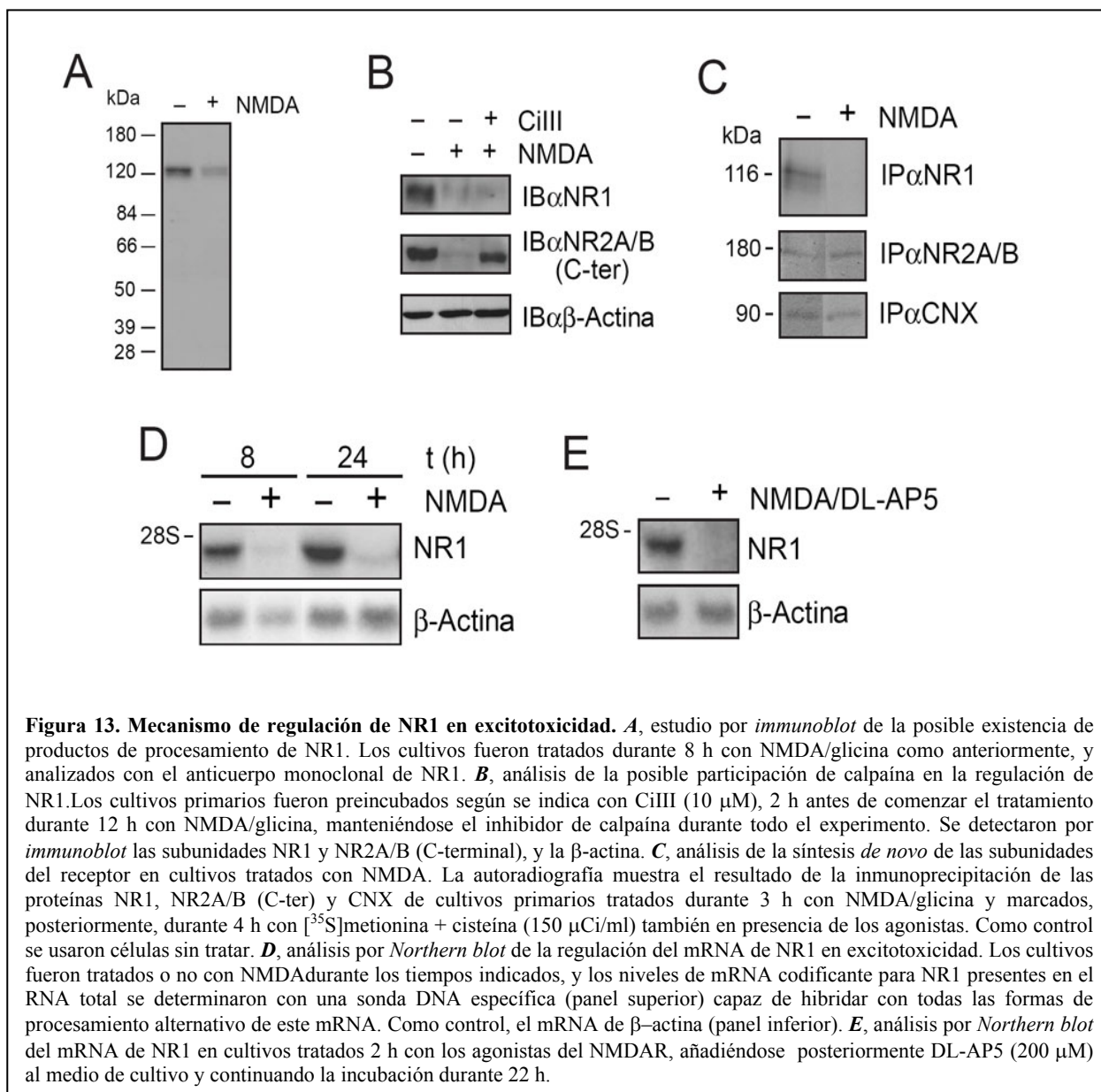
49%, similar a la observada tras 4 h de estimulación continua (Fig. 11D). Puede concluirse que la regulación negativa de NR1 es inducida durante un periodo crítico y breve tras la sobrestimulación del NMDAR, después del cual ya no puede ser bloqueada por los antagonistas del receptor.

3.4. Disminución en los niveles de mRNA de NR1 en condiciones de excitotoxicidad.

La activación de los NMDARs en cultivos de hipocampo y corteza produce la proteólisis del extremo C-terminal de las subunidades NR2A y NR2B por un mecanismo dependiente de calpaína (Dong et al., 2004; Simpkins et al., 2003; Wu et al., 2005). Hemos investigado si la actividad de esta proteasa es responsable también de la regulación de NR1 inducida por NMDA usando dos aproximaciones diferentes. Primero, analizamos si la disminución de los niveles de NR1 estaba acompañada por la aparición de formas truncadas en su extremo C-terminal. Para ello, analizamos mediante *immunoblot* extractos de neuronas tratadas con NMDA durante 8 h utilizando el anticuerpo específico para dominios extracelulares de NR1 usado anteriormente. Dada la topología de esta subunidad, con este anticuerpo esperaríamos detectar posibles fragmentos N-terminales generados por proteólisis del extremo citoplásmico C-terminal de NR1. Contrariamente a esto, la disminución de los niveles de NR1 tuvo lugar sin la aparición de fragmentos N-terminales (Fig. 13A), sugiriendo que ni la calpaína ni otras proteasas citosólicas estaban involucradas en este mecanismo. Para excluir directamente la participación de la calpaína, se analizó el efecto de sus inhibidores sobre la regulación de NR1 (Fig. 13B). Para ello, los cultivos neuronales fueron tratados con el inhibidor III de la calpaína (CiIII) previamente a la adición de los agonistas del NMDAR. La actividad de la calpaína no fue necesaria para la regulación de NR1, inducida por 12 h de tratamiento con NMDA, mientras que sí fue requerida para la regulación de las proteínas NR2A/B (Fig. 13B), analizada con un anticuerpo dirigido contra sus regiones C-terminales. Otros experimentos realizados con inhibidores específicos del proteosoma o lisosoma, también excluyeron la participación de estos sistemas proteolíticos en la regulación de NR1 (datos no mostrados).

Considerando los resultados anteriores y la cinética relativamente lenta de reducción en los niveles de NR1 (Fig. 11D), decidimos explorar la posibilidad de que la sobrestimulación del NMDAR estuviese induciendo la inhibición de la síntesis *de novo* de esta subunidad. Para ello, marcamos metabólicamente con [³⁵S]cisteína + metionina cultivos de neuronas corticales y realizamos inmunoprecipitación con anticuerpos específicos (Fig. 13C). En neuronas tratadas o

no con NMDA, se observaron niveles similares de síntesis de las proteínas calnexina o NR2A/B, mientras que este tratamiento bloqueó la síntesis *de novo* de la subunidad NR1.



Una explicación de este resultado podría ser la reducción, a consecuencia del tratamiento con NMDA, de los niveles de una o más isoformas del mRNA de NR1. El análisis por *Northern blot* con una sonda específica, capaz de detectar todas las formas de procesamiento de este mRNA, reveló que la estimulación con NMDA y glicina durante 8 h es suficiente para reducir significativamente sus niveles estacionarios (Fig. 13D). Por el contrario, los niveles de mRNA de β -actina no fueron afectados por el tratamiento. La regulación negativa del mRNA de NR1, de acuerdo con los resultados obtenidos para la proteína (Fig. 12C), es irreversible tras una breve exposición excitotóxica (Fig. 13E). Así, la disminución observada en cultivos tratados 2 h con agonistas, antes del bloqueo del NMDAR con DL-AP5 e incubación durante 22 h, es similar a

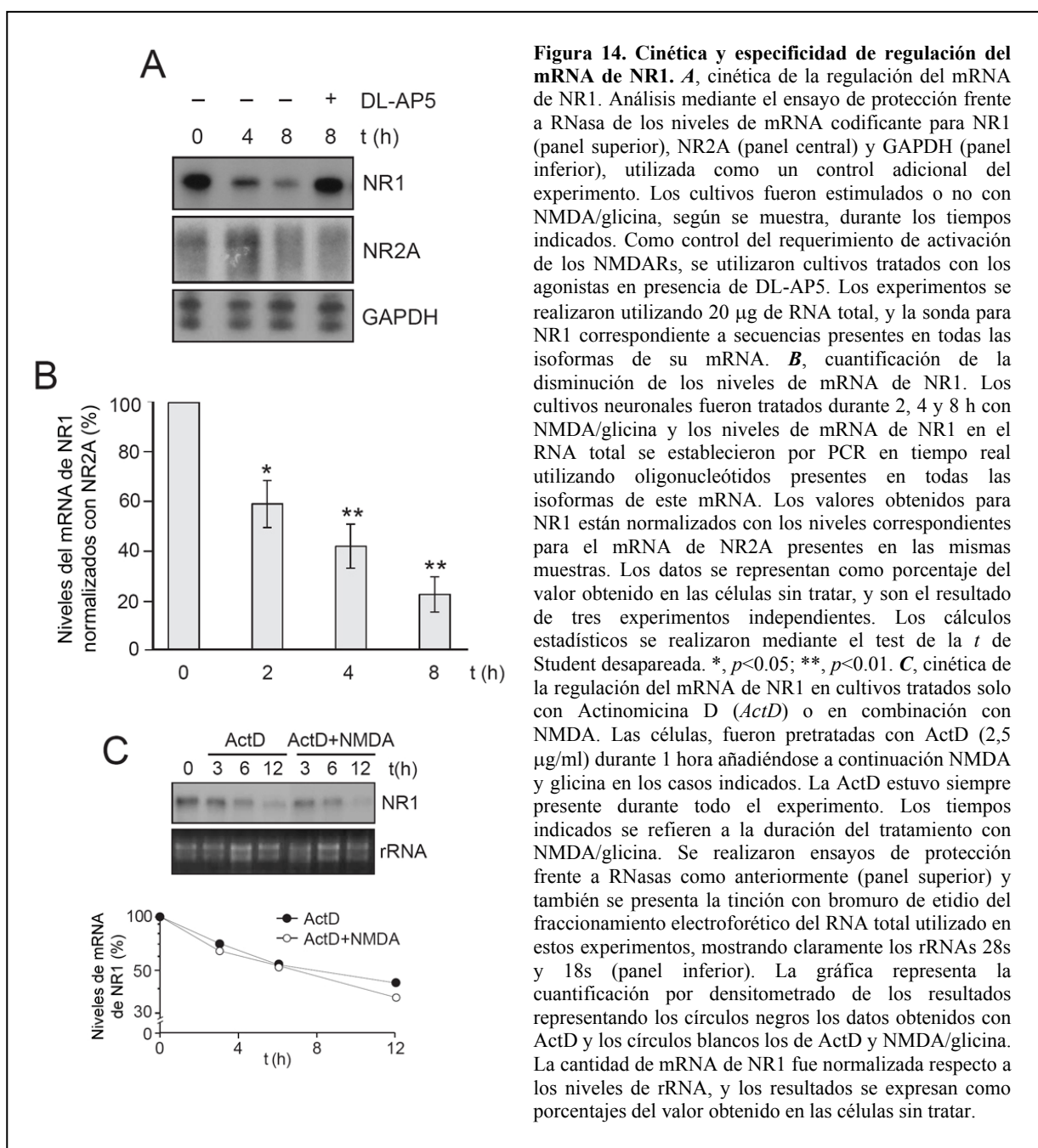
los resultados obtenidos tras 24 h de tratamiento continuado con NMDA (Fig. 13D). Estos experimentos revelan un nuevo mecanismo de regulación del NMDAR en el cual la sobreactivación de este receptor reduce específica e irreversiblemente los niveles estacionarios de las distintas isoformas del mRNA de NR1.

3.5. Inhibición de la transcripción de NR1 por sobreactivación del NMDAR.

Con objeto de descartar posibles efectos inespecíficos, hemos caracterizado la reducción de los niveles de mRNA de NR1 a tiempos tempranos de tratamiento con NMDA, cuando la muerte neuronal es todavía baja. Para ello, realizamos ensayos de protección frente a RNasas (Fig. 14A) y PCR en tiempo real (Fig. 14B). Como anteriormente, la sonda y los oligonucleótidos de NR1 usados en estos experimentos permitían detectar todas las isoformas de este mRNA. En los ensayos de protección, la cantidad de mRNA de NR1 se redujo notablemente tras 4 h de tratamiento con NMDA y mucho más dramáticamente después de 8 h (Fig. 14A, panel superior), siendo el antagonista DL-AP5 capaz de prevenir completamente esta reducción. En contraste, los niveles de mRNA para el gen de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), utilizado como control del experimento, no fueron modificados por el NMDA (Fig. 14A, panel inferior). La muerte neuronal que tenía lugar en respuesta a la estimulación del NMDAR, si bien alcanza niveles modestos a los tiempos ensayados, hacía muy importante el normalizar la expresión de NR1 respecto a algún otro mRNA neuronal. El control elegido fue el mRNA de NR2A, ya que la síntesis *de novo* de esta subunidad no era afectada por el tratamiento con NMDA (Fig. 13C) y los niveles de su mRNA, si bien muy bajos en relación a los de NR1, no se modificaban por la estimulación con NMDA (Fig. 14A, panel central). Teniendo en cuenta estas consideraciones abordamos la cuantificación de los niveles de mRNA de NR1 utilizando PCR cuantitativa en tiempo real, y normalizando los resultados respecto a los de NR2A (Fig. 14B). La exposición a NMDA durante 2 h redujo los niveles normalizados de NR1 en un 41% ($p<0.05$) respecto a los de células sin tratar, mientras que la disminución alcanzó un 58 y un 77% ($p<0.01$) para tratamientos de 4 y 8 h, respectivamente.

Una posible explicación para la disminución en los niveles del mRNA de NR1 sería que aumentara la inestabilidad del mismo. Para analizar esta posibilidad, se realizaron experimentos de protección frente a RNasas comparando la estabilidad de este mensajero en cultivos tratados con un inhibidor de la transcripción, actinomicina D, o con este antibiótico junto con el NMDA (Fig. 14C, panel superior). En este experimento, los resultados fueron normalizados en relación a

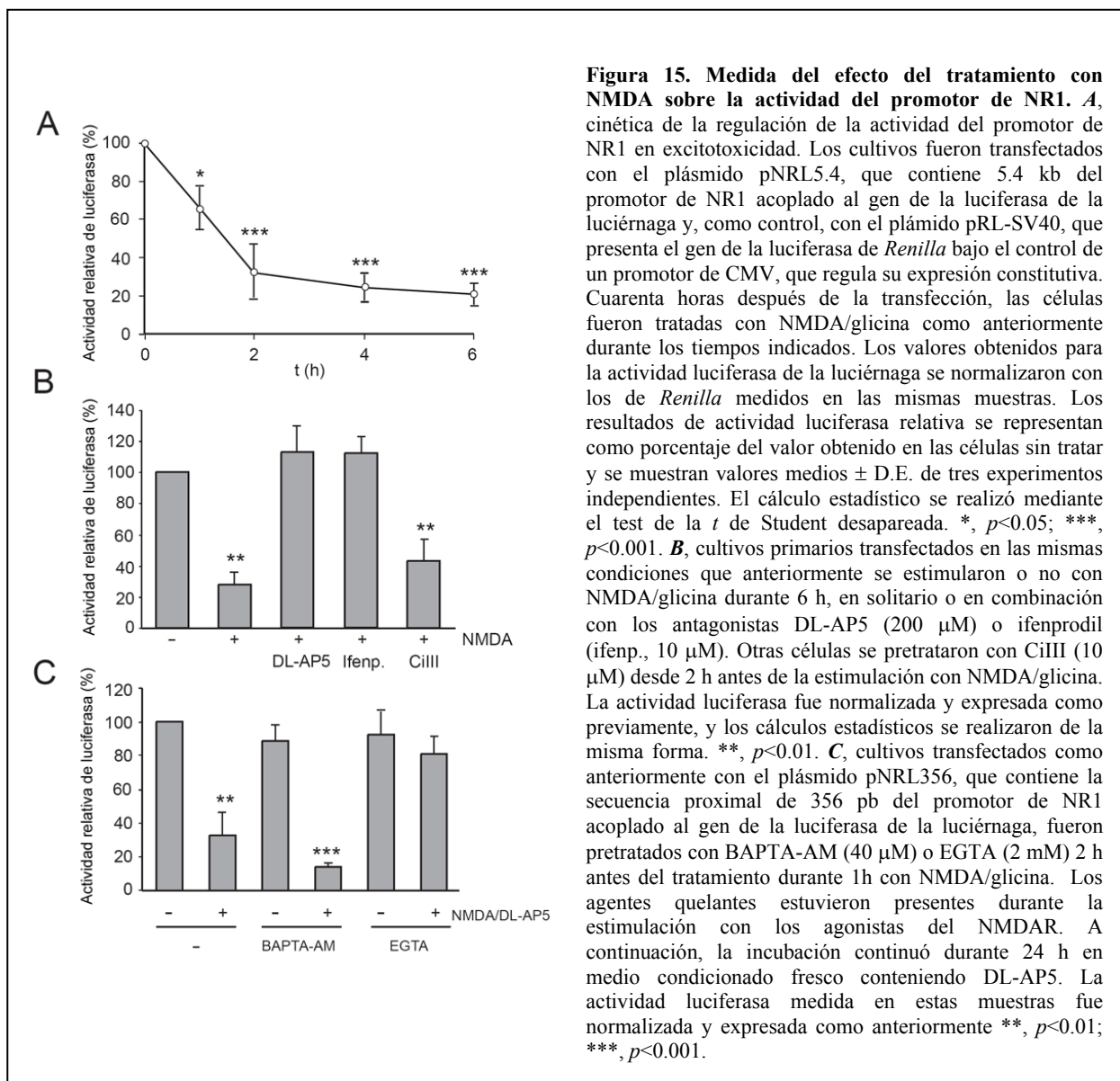
los niveles de rRNA ya que, a diferencia de lo que ocurre en general con los mRNAs, su expresión no es modificada por el tratamiento con actinomicina D (Fig. 14C, panel central). La cuantificación de estos resultados (representado en el panel inferior de la figura 14C) muestra que la vida media del mRNA de NR1 es aproximadamente la misma en células tratadas con actinomicina D, sola o en combinación con NMDA. Estos datos sugieren, por tanto, que ambos compuestos están afectando el mismo paso de regulación en la expresión de NR1 y excluyen la posibilidad de que el tratamiento con NMDA reduzca la vida media de este mRNA.



A continuación, examinamos en forma directa el efecto de la excitotoxicidad sobre la actividad del promotor de NR1, mediante el ensayo de la expresión de luciferasa cuando este gen está regulado por dicha región promotora (Fig. 15). Los cultivos de neuronas corticales fueron transfectados con el plásmido pNRL5.4 (Bai et al., 2003), que contiene 5.4 kb del promotor de NR1 acoplado al gen de la luciferasa. Para normalizar los resultados, las células fueron cotransfectadas con el plásmido pRL-SV40 que expresa el gen de la luciferasa de *Renilla* de forma constitutiva, cuyos niveles no son modificados por el tratamiento con NMDA (datos no mostrados). Determinamos la actividad luciferasa relativa en extractos celulares preparados a partir de cultivos tratados con NMDA durante diferentes tiempos (Fig. 15A). La actividad del promotor de NR1 fue reducida un 34% ($p<0.05$) y un 68% ($p<0.001$) con respecto a la de células sin tratar después de 1 y 2 h de tratamiento, respectivamente. En un experimento diferente (Fig. 13B), la inhibición de la actividad del promotor de NR1 inducida por el tratamiento con NMDA durante 6 h (79%, $p<0.001$) fue completamente revertida por el antagonista ifenprodil, en la misma medida que por el DL-AP5. Por tanto, la inhibición transcripcional del promotor de NR1 requiere la activación de NMDARs formados por subunidades NR2B. En contraste, la reducción en la actividad promotora de NR1 fue de un 57% ($p<0.01$) en los cultivos tratados con CiIII y NMDA, mostrando que no se requiere la actividad de la calpaína para la inhibición de la transcripción de NR1.

De acuerdo con los resultados anteriores (Figs. 12C y 13E), una exposición breve a concentraciones elevadas de NMDA fue suficiente para inhibir irreversiblemente, a tiempos posteriores, la actividad del promotor de NR1 (Fig. 15C). En estos experimentos se usó el plásmido pNRL356, que contiene tan solo 356 pb del promotor de NR1 acoplados al gen de la luciferasa (29-R1). Esta pequeña secuencia del promotor es suficiente para conferir regulación por NMDA al gen de luciferasa en las neuronas transfectadas, observándose una disminución del 67% en la actividad luciferasa medida a las 24 h en neuronas tratadas 2 h con NMDA previamente al bloqueo del NMDAR con DL-AP5. Usando este mismo procedimiento experimental, hemos analizado el requerimiento de la función del NMDAR como canal de Ca^{2+} para la regulación transcripcional de NR1 (Fig. 15C). La preincubación de los cultivos corticales durante 2 h con el quelante del Ca^{2+} extracelular EGTA (2 mM) previno completamente la disminución en la actividad luciferasa inducida por el NMDA. En contraste, el tratamiento con BAPTA-AM (40 μM), un quelante del Ca^{2+} intracelular, no tuvo ningún efecto sobre la inhibición de la actividad del promotor de NR1. Probablemente, la capacidad quelante de este compuesto es insuficiente para neutralizar el rápido incremento local de Ca^{2+} que sucede después

de la sobreactivación del NMDAR. Estos resultados demuestran, por tanto, que la entrada de iones de Ca^{2+} desde el exterior celular, producida a consecuencia de la estimulación excesiva, incluso por periodos cortos de tiempo, de NMDARs conteniendo subunidades NR2B induce la inhibición transcripcional específica del gen de NR1.



3.6. Regulación de la expresión del mRNA de NR1 en isquemia cerebral.

Considerando los resultados anteriores, obtenidos en un modelo celular de excitotoxicidad *in vitro*, era importante establecer si un mecanismo similar pudiera ser responsable de la regulación de NR1 en el modelo de isquemia cerebral, donde el proceso de excitotoxicidad tiene lugar *in vivo*. En primer lugar, hemos caracterizado la cinética de regulación negativa de NR1 mediante su inmunodetección en extractos de proteína preparados utilizando corteza cerebral de

hemisferios contralaterales (C) e ipsilaterales (I) de animales sometidos a la oclusión de la AMC y distintos tiempos de reperfusión (Fig. 16A). En relación a los niveles de NR1 en el hemisferio contralateral, la cantidad de esta proteína en la región infartada disminuye progresivamente con el tiempo de reperfusión. Así, la disminución de NR1 es moderada tras las 2 primeras horas de reperfusión, pero sus niveles son prácticamente indetectables tras 24 h. Sin embargo no se detectan cambios significativos en los niveles de NR1 en animales sacrificados inmediatamente después del periodo de oclusión. Para demostrar que la disminución de los niveles de NR1 es debida al proceso de isquemia y no es una consecuencia inespecífica de la muerte neuronal asociada, hemos comprobado que los niveles de β -actina y de NSE no son afectados por la oclusión.

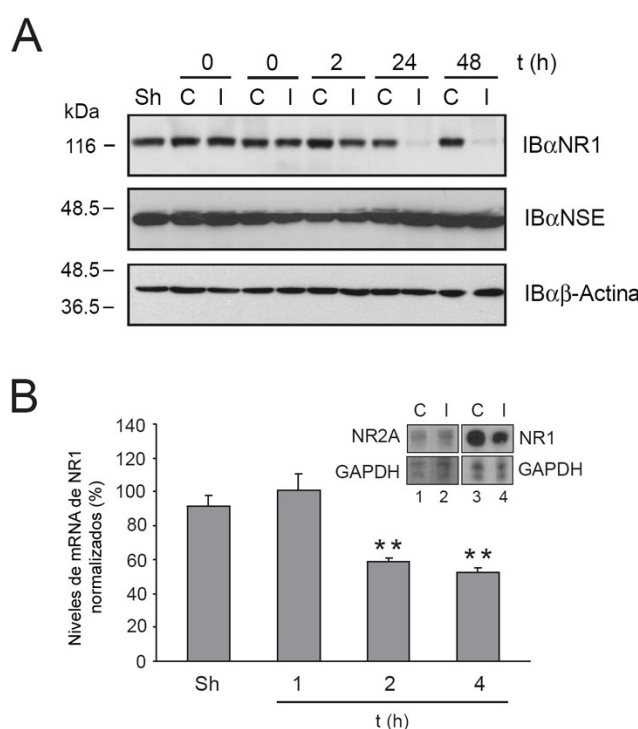


Figura 16. Caracterización de la regulación de la proteína NR1 y su mRNA codificante en isquemia cerebral transitoria. **A**, inmunodetección en filtro de las proteínas NR1, NSE y β -actina en cerebro de ratas sometidas, o no, a 1 h de oclusión de la AMC y posterior reperfusión durante los tiempos indicados. Los extractos proteicos (50 μ g) se obtuvieron de la región infartada (I) o del área equivalente en el hemisferio contralateral (C). Como control adicional, se utilizaron cerebros de ratas “sham-operated” (Sh). **B**, cuantificación de los niveles de mRNA de NR1 en la corteza cerebral de animales sometidos a isquemia. Ensayo de protección frente a RNasas utilizando sondas específicas para NR1, NR2A y GAPDH como anteriormente, y RNA total (15 μ g) aislado de las cortezas de rata sometidas a MCAO seguida de 1, 2 o 4 h de reperfusión. La cantidad de mRNA de NR1 fue normalizada, respecto a la GAPDH determinada en las mismas muestras. Los valores normalizados obtenidos para la región infartada se expresan en relación a los del área contralateral correspondiente, a los que se asignó un valor arbitrario de 100%. En los animales sham-operated se compararon el hemisferio izquierdo con el derecho. Los datos muestran la media \pm D.E. de la cantidad de mRNA de NR1 remanente a cada tiempo de reperfusión después de la isquemia ($n=3$). El análisis de la significación estadística de las diferencias entre los hemisferios contralateral e ipsilateral se realizó mediante el test de la t de Student desapareada. **, $p<0.01$. La imagen insertada en esta figura muestra un resultado representativo de un animal sometido a MCAO y 4 h de reperfusión. El ensayo de protección frente a RNasas permitió determinar los niveles de los mRNAs de NR2A y GAPDH (carriles 1 y 2) o de NR1 y GAPDH (carriles 3 y 4).

A continuación, para investigar si la disminución en NR1 pudiera ser debida a una disminución en los niveles de mRNA como en el modelo *in vitro*, realizamos ensayos de protección frente a RNasas (Fig. 16B). Analizamos RNA total extraído de las regiones isquémicas y de sus áreas correspondientes del hemisferio contralateral de animales sometidos a la oclusión de la AMC, seguida de 1, 2 o 4 h de reperusión. Los niveles de mRNA de NR1 medidos en el hemisferio ipsilateral fueron normalizados respecto a GAPDH, y se representan como el porcentaje de los valores normalizados para el hemisferio contralateral. En el caso de los animales “sham-operated”, se comparó el hemisferio derecho con respecto al izquierdo. La disminución en los niveles del mRNA de NR1 fue del 41% ($p<0.01$) en los animales sometidos a 2 h de reperusión, y de un 47% para los de 4 h ($p<0.01$). En los animales “sham-operated”, o sometidos a tan solo 1 h de reperusión, la variación en la expresión del mRNA no fue estadísticamente significativa. La reducción fue específica para el mRNA de NR1 y no se observaron cambios para el mRNA codificante para NR2A (inserto en Fig. 16B). En conclusión, nuestros experimentos muestran que la isquemia cerebral produce una regulación negativa del mRNA de NR1 a tiempos de reperusión tempranos, y una disminución consecuente en los niveles de esta subunidad obligatoria del NMDAR.

3.7. Regulación de las subunidades NR2A y NR2B en el modelo celular de excitotoxicidad.

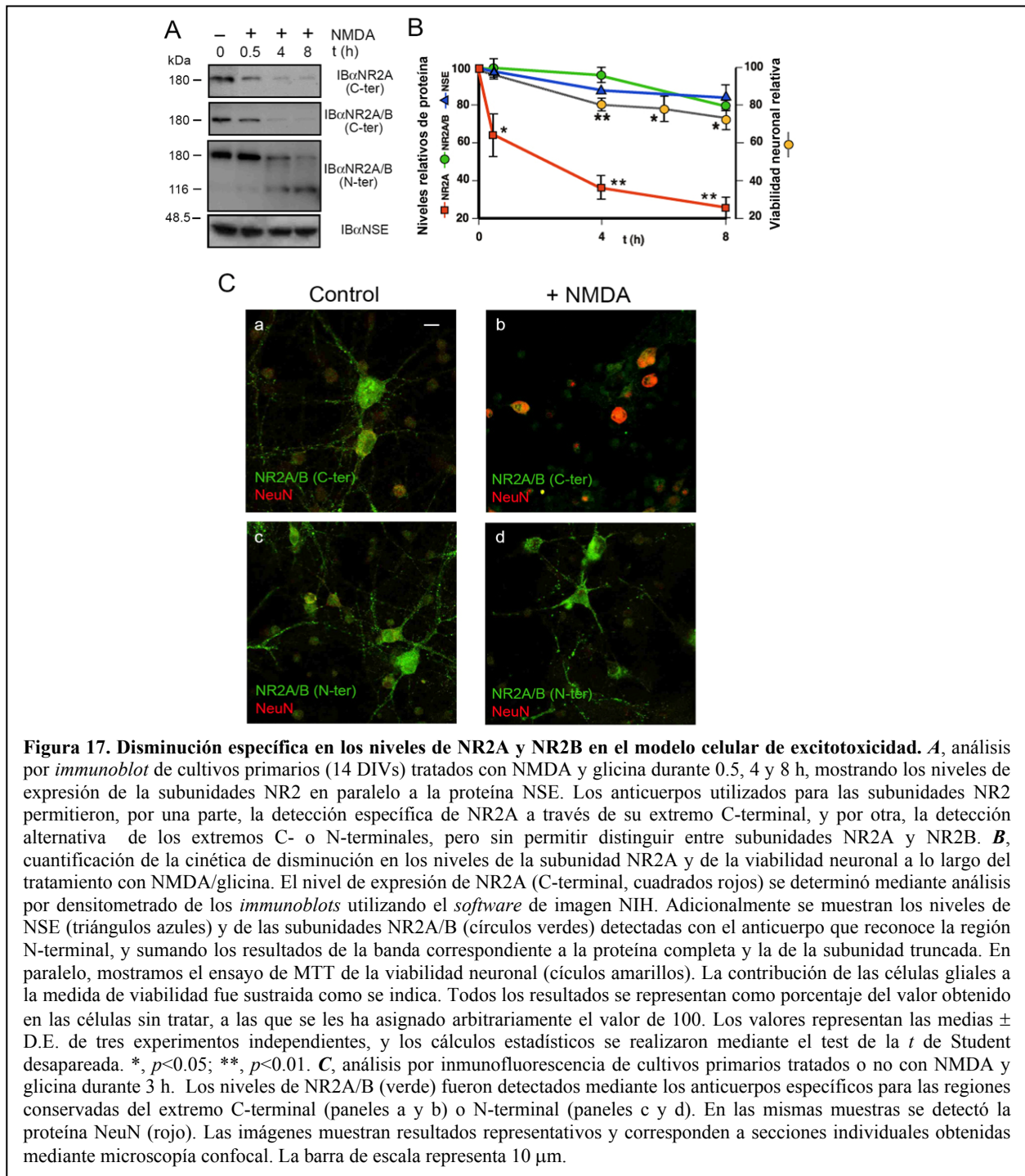
Los experimentos de inmunohistoquímica anteriores mostraron la regulación negativa de las subunidades NR2A y NR2B del NMDAR en isquemia cerebral (Fig. 10). Decidimos utilizar el sistema de excitotoxicidad *in vitro*, para caracterizar, también en este caso, cual podría ser el mecanismo responsable. En primer lugar analizamos mediante inmunodetección en filtro los niveles de estas subunidades en cultivos de neuronas corticales, tratados con NMDA y glicina como anteriormente durante diferentes tiempos. Utilizando el anticuerpo específico para la región C-terminal de la subunidad NR2A, primeramente demostramos la regulación negativa de esta subunidad inducida en situaciones de excitotoxicidad *in vitro* (Fig. 17A, panel superior). A continuación, se estudió la cinética del proceso de regulación mediante la cuantificación de tres experimentos independientes (Fig. 17B), observándose una disminución muy rápida en los niveles de esta proteína. Así, 30 min de tratamiento fueron suficientes para reducir la expresión de NR2A en un 45% ($p<0.01$) con respecto a las células sin tratar. Por otra parte, tratamientos más largos, de 4 y 8 h, produjeron una disminución en los niveles de esta proteína de aproximadamente un 80% ($p<0.01$). El análisis de los niveles de NR2A y NR2B conjuntamente, mediante el anticuerpo dirigido contra los dominios C-terminales conservados muestra la

disminución de ambas subunidades asociada al tratamiento con NMDA (Fig. 17A), y su cuantificación dio resultados muy similares a los demostrados anteriormente para NR2A (datos no mostrados). Por otra parte, no se observó ninguna modificación en los niveles de β -actina (datos no mostrados) y tan solo una disminución muy lenta para NSE, con una cinética similar a la de la reducción en la viabilidad neuronal (Figs. 17A y 17B). Por el contrario, la reducción en los niveles de NR2A fue del 74% tras 8 h de tratamiento con NMDA, efecto marcadamente superior al observado sobre la viabilidad, que tan solo disminuyó un 25% a ese mismo tiempo (Fig. 17B). Por tanto, estos resultados demuestran que la disminución en los niveles de NR2A no es una consecuencia inespecífica de la muerte celular por excitotoxicidad.

Una posibilidad es que la regulación de NR2A en excitotoxicidad fuese debida al procesamiento proteolítico de su extremo C-terminal. Si esta hipótesis fuese correcta, sería posible detectar la subunidad NR2A truncada utilizando anticuerpos dirigidos específicamente contra sus secuencias N-terminales. Dada la pequeña eficacia de los anticuerpos disponibles comercialmente, decidimos utilizar un anticuerpo dirigido contra regiones N-terminales conservadas en las subunidades NR2A y NR2B (Fig 17A). Los resultados muestran la acumulación progresiva de un fragmento (M_r 115 kDa) a lo largo de la duración del tratamiento con NMDA, acompañada de la disminución en los niveles de la proteína completa. Observaciones previas de otros grupos han mostrado, en experimentos donde se realizaban exposiciones muy cortas a glutamato, el procesamiento parcial de NR2B en neuronas de cualquier grado de maduración (Simpkins et al., 2003) y el de NR2A, solamente en neuronas jóvenes o inmaduras (Dong et al., 2004). A diferencia de estos resultados, en el modelo de excitotoxicidad utilizado aquí, la fragmentación de las subunidades NR2 es prácticamente completa, cuando la duración del tratamiento es suficientemente larga, y las subunidades truncadas permanecen estables durante varias horas después de iniciado el tratamiento con el agonista. Estos datos, en conjunto, demuestran que las subunidades NR2 son procesadas en su extremo C-terminal durante el proceso de excitotoxicidad, no obstante, se requiere un estudio específico e independiente para cada una de las subunidades.

Hemos confirmado estas observaciones realizando inmunofluorescencia de neuronas permeabilizadas con los anticuerpos que reconocen las regiones conservadas N- y C-terminales de las subunidades NR2 (Fig. 17C). En las células sin tratar observamos para ambos anticuerpos una clara inmunoreactividad en el cuerpo celular de las neuronas y el punteado característico en las dendritas (Fig 17C, paneles a y c). Por otra parte, la estimulación durante 3 h con NMDA y

glicina redujo dramáticamente la tinción con el anticuerpo C-terminal, un resultado similar al encontrado cuando se usa el anticuerpo específico dirigido contra estas mismas secuencias de la subunidad NR2A (datos no mostrados). En contraste, la inmunocitoquímica con el anticuerpo N-terminal mostró niveles comparables de NR2A y NR2B en neuronas tratadas o no con NMDA (Fig 17C, paneles c y d). Sin embargo, en este último caso, se observaron ciertos cambios morfológicos en las células tratadas que incluyen retracción de las neuritas y varicosidades indicativas del inicio de la degeneración neuronal (Fig. 17C, panel d).

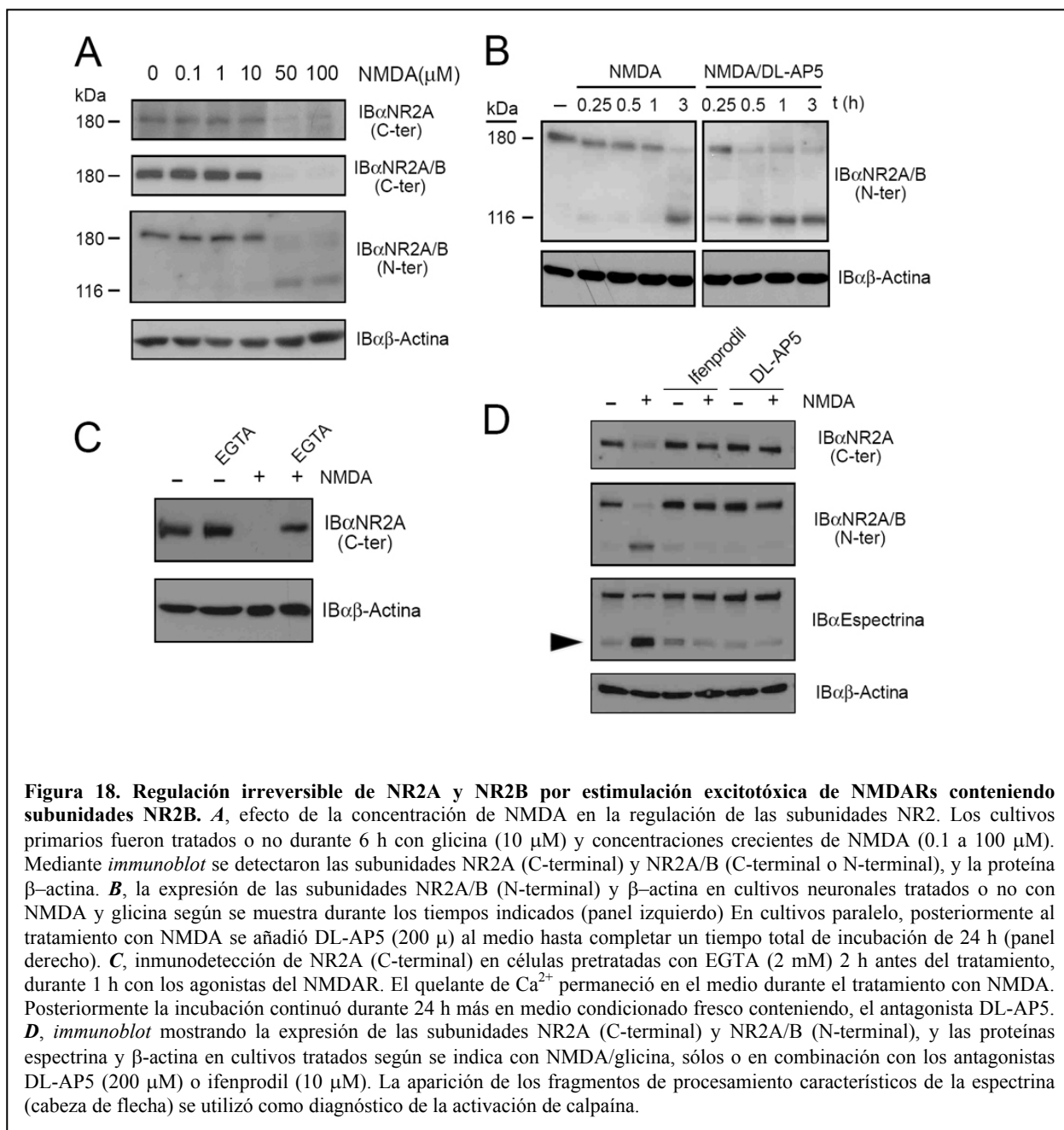


En conclusión, estos experimentos demuestran el procesamiento de la región C-terminal de las subunidades NR2 en neuronas corticales tratadas con concentraciones excitotóxicas de NMDA, al tiempo que muestran la estabilidad de los fragmentos N-terminales de estas subunidades.

3.8. Requerimientos de la estimulación del NMDAR para la regulación de las subunidades NR2.

Al igual que se mostró anteriormente para la subunidad NR1, hemos estudiado si el mecanismo de regulación de NR2 está asociado o no a una estimulación del NMDAR en condiciones de excitotoxicidad. Para ello, se incubaron cultivos de neuronas corticales durante 6 h con glicina (10 μ M) y diferentes concentraciones de NMDA (de 0,1 a 100 μ M). Observamos una ligera disminución en los niveles de la subunidad NR2A a concentraciones de NMDA de 10 μ M, no obstante, igual que sucedía con NR1, fueron necesarias concentraciones más altas de agonista para que esta disminución fuera eficiente (Fig. 18A). Cuando se utilizaron los anticuerpos que reconocen regiones conservadas de las subunidades NR2 los resultados fueron muy similares (Fig. 18A, paneles intermedios). Por tanto, en el modelo utilizado, el procesamiento eficiente de ambas subunidades NR2A y NR2B requiere concentraciones de NMDA en el rango excitotóxico.

Considerando que el procesamiento de NR2A podría tener un papel crítico en la degeneración neuronal asociada al proceso de excitotoxicidad, y teniendo en cuenta la importancia que se les otorga a los antagonistas del receptor en el diseño de estrategias neuroprotectoras, era fundamental determinar si estas moléculas podían prevenir o no la regulación de NR2A después de una breve exposición excitotóxica al agonista. En nuestro modelo celular de excitotoxicidad, el tratamiento con NMDA durante 30 min seguido de protección con DL-AP5 (200 μ M) las siguientes 24 h (Fig. 18B, panel derecho) tiene el mismo efecto sobre el procesamiento de las subunidades NR2 que 3 h de tratamiento continuo con NMDA (Fig. 18B, panel izquierdo). Por otra parte un tratamiento más corto, de 15 min, produjo resultados intermedios. Estos experimentos permiten concluir que, después de un periodo crítico, la regulación de las subunidades NR2A y NR2B inducida en condiciones de excitotoxicidad no puede ser revertida por antagonistas del NMDAR.



La activación excitotóxica del NMDAR conduce a la entrada masiva de Ca^{2+} en las neuronas (Mori and Mishina, 1995). En experimentos anteriores, habíamos caracterizado que para la regulación de la transcripción de la subunidad NR1 es necesaria la entrada de Ca^{2+} (Fig. 15C). Para caracterizar si el mecanismo de regulación de las subunidades NR2 tiene requerimientos análogos, se realizó *immunoblot* de las mismas a partir de cultivos tratados con NMDA en presencia de EGTA (Fig 18C). Al igual que se hizo en la caracterización de NR1, los efectos tóxicos que producen los tratamientos prolongados con quelantes de Ca^{2+} se evitaron eligiendo un modelo de exposición corta a NMDA (1 h), seguida por el bloqueo del NMDAR con DL-AP5 durante 24 h. Los cultivos fueron preincubados con EGTA (2 mM) 2 h antes de la adición del

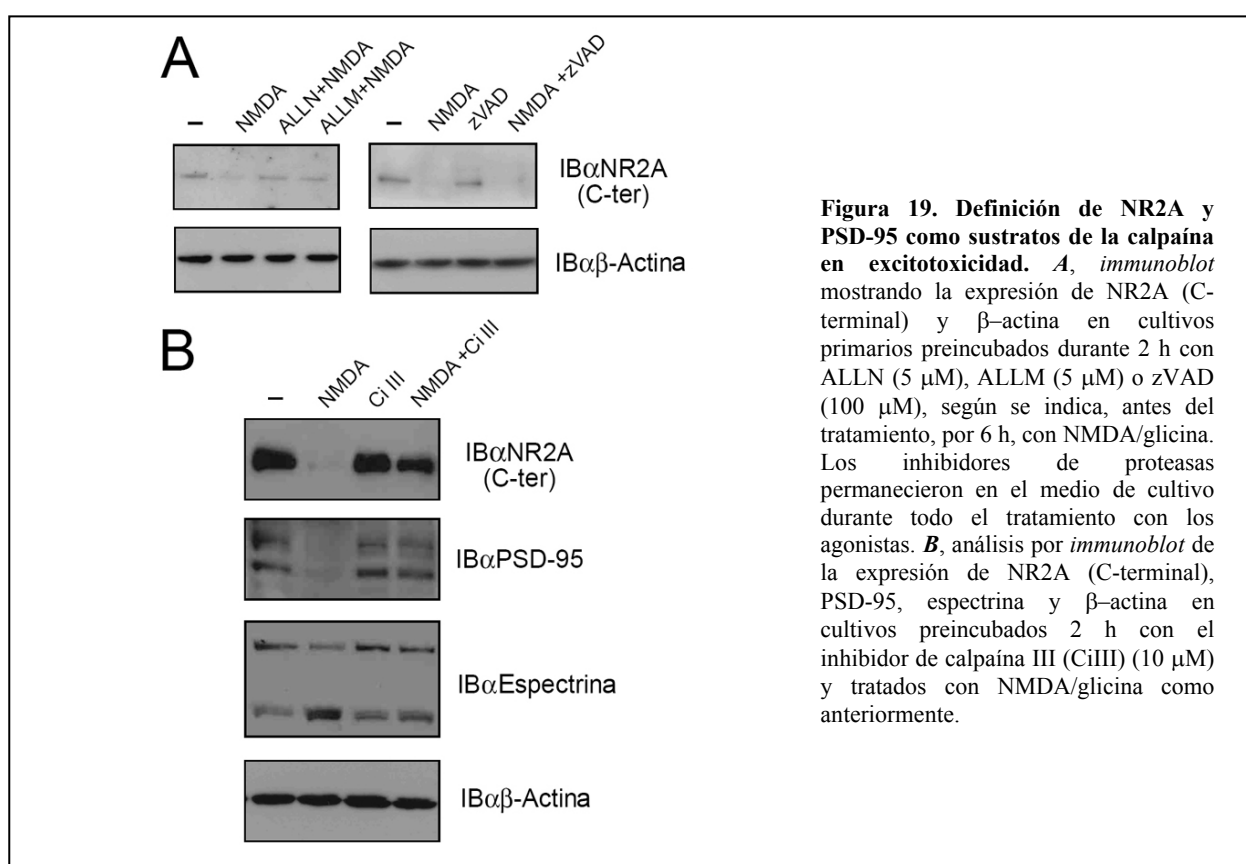
NMDA, tratamiento que fue capaz de prevenir la disminución de los niveles de NR2A medidos 24 h después (Fig. 18C, panel superior). El resultado fue similar utilizando el anticuerpo dirigido contra el extremo C-terminal de NR2A y NR2B (datos no mostrados). Por tanto, este experimento demuestra que el mecanismo implicado en la regulación de las subunidades NR2 tras la sobreestimulación de los NMDARs es dependiente de la entrada de Ca^{2+} en las neuronas.

Como ya se comentó previamente, la muerte por excitotoxicidad se induce a través de los NMDARs localizados en posiciones extrasinápticas, donde NR2B es la subunidad NR2 mayoritaria. Para caracterizar si la regulación de las subunidades NR2 inducida en excitotoxicidad requiere específicamente de subunidades NR2B, se usó el antagonista ifenprodil, como anteriormente. La *immunoblot* de las subunidades NR2 muestra que este compuesto previene la regulación de las subunidades NR2A y NR2B inducida por NMDA, de forma similar al antagonista general del NMDAR DL-AP5 (Fig. 18D). Dado que a este tiempo las neuronas en cultivo expresan subunidades NR2A y NR2B, puede concluirse que la regulación de las subunidades NR2 requiere de la sobreactivación específica de NMDARs de composición NR1/NR2B o NR1/NR2A/NR2B.

Los resultados anteriores mostrando el requerimiento de la entrada de Ca^{2+} para la regulación de las subunidades NR2, y observaciones previas de otro laboratorio demostrando proteólisis parcial de NR2B mediada por calpaína en un modelo celular diferente de excitotoxicidad (Simpkins et al., 2003), nos llevaron a plantearnos si esta proteasa pudiera producir el procesamiento extensivo de la subunidad NR2A en nuestro modelo celular de excitotoxicidad. La calpaína es una proteasa dependiente de calcio que tiene un papel efector fundamental en los procesos de excitotoxicidad e isquemia (Hong et al., 1994a; Hong et al., 1994b; Siman and Noszek, 1988). En primer lugar, realizamos experimentos para confirmar la activación de la calpaína en nuestro modelo mediante el análisis del procesamiento de la espectrina (240 kDa), un sustrato de esta proteasa que da lugar a fragmentos estables de 145/150 kDa. El análisis de los extractos de cultivos neuronales tratados con NMDA mostró la aparición de dichos fragmentos, en paralelo al procesamiento de las subunidades NR2A y NR2B (Fig. 18D). Además, el tratamiento con ifenprodil o DL-AP5 bloqueó la activación de la calpaína y el procesamiento de las subunidades NR2. Todos estos datos sugieren fuertemente que la calpaína podría ser responsable del mecanismo de regulación observado para la subunidad NR2A en nuestro modelo de excitotoxicidad celular.

3.9. La subunidad NR2A y PSD-95 son sustratos de la calpaína en neuronas maduras.

Para confirmar el papel de la calpaína en la regulación de NR2A, se han caracterizado los niveles de esta subunidad en cultivos neuronales tratados durante 6 h con NMDA, en presencia de diferentes inhibidores de proteasas (Fig. 19A). En primer lugar, la disminución en los niveles de NR2A en excitotoxicidad fue bloqueado por inhibidores de las cisteín-proteasas neutras ALLN (5 μ M) y ALLM (5 μ M), mientras que zVAD (10 μ M), un inhibidor general de caspasas, no tuvo ningún efecto. Este resultado apoya la hipótesis de que la calpaína, una cisteín-proteasa neutra, podría estar involucrada en el proceso.



A continuación utilizamos un inhibidor específico de calpaína, el inhibidor III (CiIII), 10 μ M para demostrar la participación de esta proteasa en la regulación de NR2A. La preincubación con CiIII prácticamente bloqueó la aparición de los fragmentos característicos de espectrina y, por tanto, la actuación de la calpaína inducida por el tratamiento con NMDA. Además, este inhibidor fue capaz de revertir mayoritariamente el procesamiento de NR2A inducido en condiciones de excitotoxicidad, demostrando la participación de la calpaína en este proceso. Por otra parte, la disminución en la expresión de PSD-95 mostrada previamente en isquemia cerebral (Fig. 8) nos decidió a caracterizar la estabilidad de esta proteína en el modelo de excitotoxicidad *in vitro*. La

immunoblot de esta proteína con anticuerpos específicos muestra una disminución dramática en los niveles de PSD-95 en neuronas tratadas 6 h con NMDA por un mecanismo dependiente de la activación de la calpaína (Fig 19B). En conjunto, estos resultados muestran por primera vez un procesamiento extensivo mediado por calpaína de la subunidad NR2A del NMDAR, junto con PSD-95, en neuronas corticales sometidas a condiciones excitotóxicas.

Nuestros resultados demostrando el procesamiento de NR2A en neuronas de 14 DIVs entraban en aparente contradicción con datos publicados indicando que esta subunidad no era regulada por el tratamiento con NMDA de neuronas maduras, pero sí en el caso de neuronas inmaduras (Simpkins et al., 2003). Además, en estos trabajos se había sugerido que la falta de regulación de NR2A era debida a un aumento de su interacción con PSD95 durante la maduración neuronal, que la protegía del procesamiento por calpaína (Dong et al., 2004). Aunque en nuestro modelo celular las neuronas de 14 DIVs son consideradas maduras, diferencias sutiles en las condiciones de cultivo pueden modificar la cinética de maduración. Por ello, decidimos comparar la regulación de NR2A en neuronas de 14 y 21 DIVs tratadas con NMDA durante 30 min o 4 h (Fig. 18). En el caso de NR2A, se muestra el resultado de un experimento representativo (Fig. 20A) y el análisis estadístico de tres ensayos independientes (Fig. 20B). En las células sin tratar, se observó un incremento en los niveles de NR2A con el tiempo en cultivo, consistente con observaciones previas (Mizuta et al., 1998). Por otra parte, en los cultivos tratados con el agonista durante solo 30 min observamos una disminución en los niveles de NR2A respecto a las células sin tratar que, no obstante, no era significativa para las neuronas de 21 DIVs (Fig. 20B). Sin embargo, tras 4 h de tratamiento los niveles de NR2A disminuyeron de forma similar, independientemente del tiempo en cultivo, siendo la reducción de aproximadamente un 80% para ambos casos ($p<0.01$). Los niveles de proteína NSE no se modificaron por el tratamiento (Fig. 20A, panel inferior). Estos resultados demuestran que la subunidad NR2A está regulada por el tratamiento con NMDA en neuronas de distintos tiempos en cultivo y, si acaso, la cinética del procesamiento por calpaína podría ser algo más lenta en los cultivos de 21 DIVs, explicando las observaciones previas realizadas siempre mediante estimulaciones muy breves (<30 min) con el agonista (Dong et al., 2004; Simpkins et al., 2003).

En cuanto a PSD-95 hemos estudiado si sufre procesamiento en cultivos neuronales de 21 DIVs de forma similar a lo observado previamente para neuronas de 14 DIVs (Fig. 20A). Los resultados confirmaron observaciones previas mostrando un incremento muy significativo de PSD-95 con el tiempo en cultivo (Sans et al., 2000). Además, en células sometidas a

excitotoxicidad el procesamiento de PSD-95 es muy rápido, y ocurre paralelamente a la activación de la calpaína tanto en cultivos de 14 como de 21 DIVs (Fig. 20A, panel intermedio). Finalmente, tras 4 h de tratamiento, los niveles de PSD-95 fueron prácticamente indetectables en ambos tipos de cultivos. En conclusión, los resultados presentados muestran una disminución consistente de los niveles de NR2A y PSD-95 inducida por el tratamiento con NMDA en neuronas a diferentes tiempos en cultivo, no obstante, los niveles elevados de PSD-95 podrían inicialmente ralentizar la regulación de NR2A en las neuronas maduras.

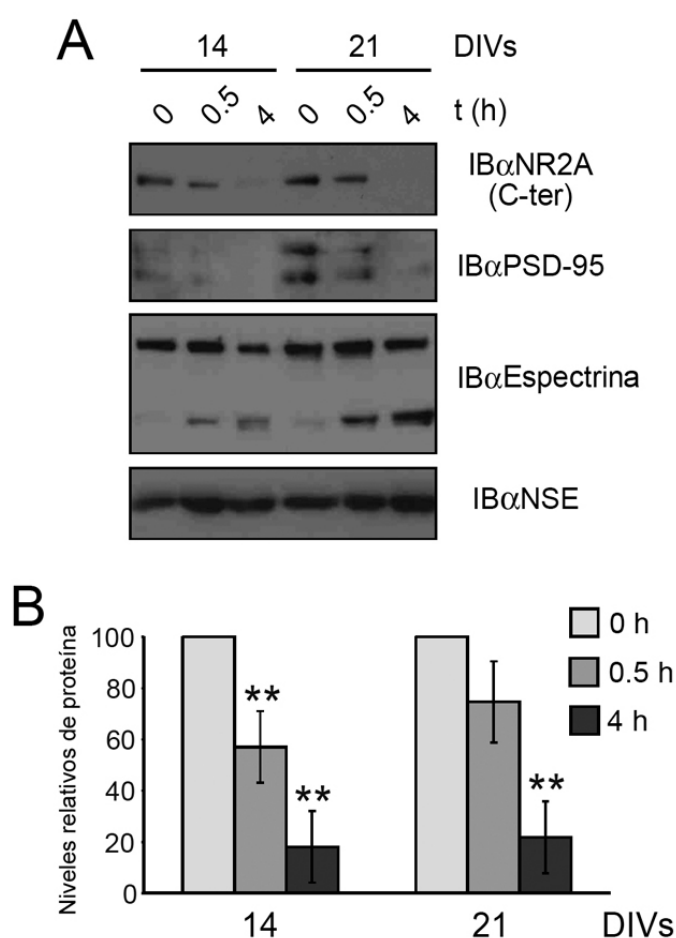


Fig 20. Procesamiento de NR2A y PSD-95 inducido por NMDA en neuronas corticales a diferentes tiempos en cultivo. *A*, *immunoblot* mostrando la disminución en la expresión de NR2A (C-terminal) y PSD-95 en cultivos de neuronas corticales, de 14 y 21 DIVs, tratados o no durante 30 min y 4 h con los agonistas NMDA/glicina. Se muestra en paralelo el análisis de las proteínas espectrina y NSE. *B*, cuantificación de la disminución de NR2A mediante análisis densitométrico de *immunoblots* utilizando el *software* de imagen NIH. Los datos se representan como porcentaje de los resultados obtenidos en las células sin tratar, a los que asignamos un valor arbitrario del 100%. Se muestra la media \pm D.E. de tres experimentos independientes y los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada. **, $p < 0.01$.

3.10. Análisis de la localización celular e interacciones de las formas truncadas de las subunidades NR2.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran la estabilidad de los fragmentos N-terminales de NR2A y NR2B producidos por la activación de la calpaína en excitotoxicidad. Dadas las diferencias en función biológica entre las proteínas NR2, era importante caracterizar el destino de las formas truncadas de cada subunidad por separado, estudios imposibles de abordar debido a la ineficacia de los anticuerpos que no reconocen aminoácidos no conservados de las regiones N-terminales de NR2A de NR2B y que, teóricamente, permitiera distinguirlas. Con objeto de solucionar este problema, decidimos expresar subunidades NR2 recombinantes fusionadas en sus extremos N-terminales con proteínas fluorescentes (YFP) o marcadas con un epítipo de la hemaglutinina (HA), para reproducir con fidelidad el proceso inducido por el tratamiento con NMDA sobre los NMDARs recombinantes. Elegimos realizar estos experimentos en cultivos primarios de neuronas. El sistema de expresión elegido fueron los lentivirus y se generaron vectores capaces de expresar HA-NR2A, HA-NR2B y YFP-NR2B bajo el control del promotor de sinapsina, que garantiza la expresión de las proteínas recombinantes exclusivamente en las células neuronales, tal como se demostró anteriormente (Fig 7). En un primer experimento de caracterización de los virus generados, cultivos neuronales de 7 DIVs fueron doblemente infectados con los lentivirus LV-SYN-HA-NR2A y LV-SYN-YFP-NR2B, analizándose por inmunofluorescencia 7 días después la expresión y localización de las proteínas NR2 recombinantes. Utilizamos anticuerpos dirigidos contra el epítipo HA y la proteína fluorescente GFP para detectar las subunidades NR2 recombinantes, y anticuerpos específicos para NR2A para visualizar, además, dicha subunidad endógena (Fig. 21A). Los resultados demostraron la infección casi completa de las neuronas en los cultivos primarios (panel a), y la colocalización de las proteínas NR2 recombinantes entre sí (panel b) y con las subunidades endógenas (panel a). Un análisis comparativo de la expresión de NR2A en neuronas infectadas con LV-SYN-HA-NR2A o sin infectar determinó que los niveles de proteína recombinante eran aproximadamente un 50% respecto de los de las subunidades endógenas (datos no mostrados). Finalmente, decidimos confirmar que las proteínas NR2 recombinantes se localizaban correctamente en la membrana celular. Para ello, analizamos mediante inmunofluorescencia de células sin permeabilizar cultivos neuronales infectados con los virus LV-SYN-HA-NR2A o LV-SYN-HA-NR2B conjuntamente con SYN-GFP, que facilitó la localización de las células infectadas por inmunofluorescencia directa (Fig. 21B, paneles a y c). Observamos el patrón de expresión característico de los NMDAR, con marcaje de la membrana del cuerpo neuronal y en

las neuritas (ver imágenes aumentadas en los paneles b y d). Estos experimentos, en conjunto, demuestran que las subunidades NR2 recombinantes son expresadas específica y eficientemente en neuronas mediante el uso de lentivirus, y tienen una correcta localización sobre la superficie celular.

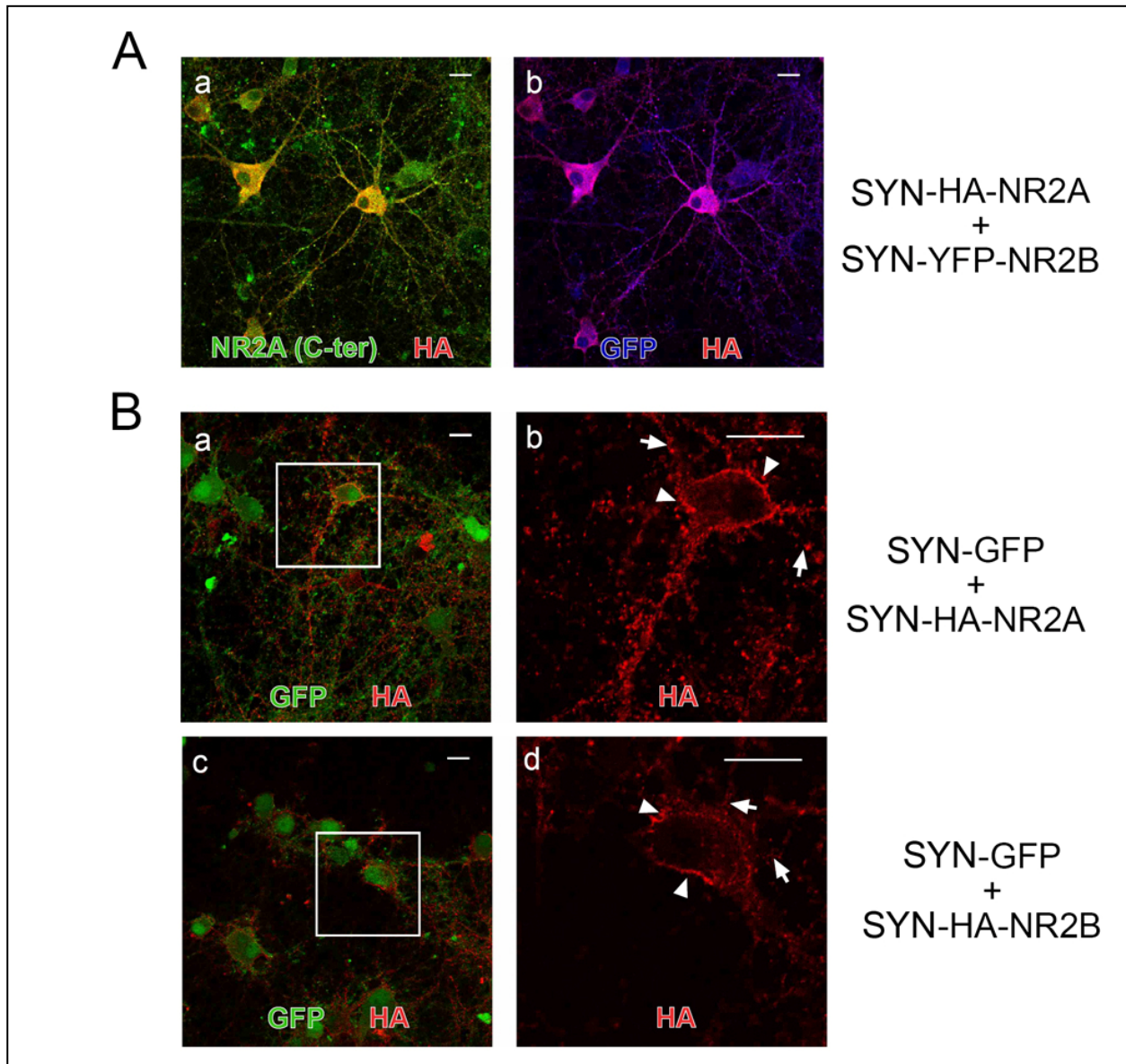
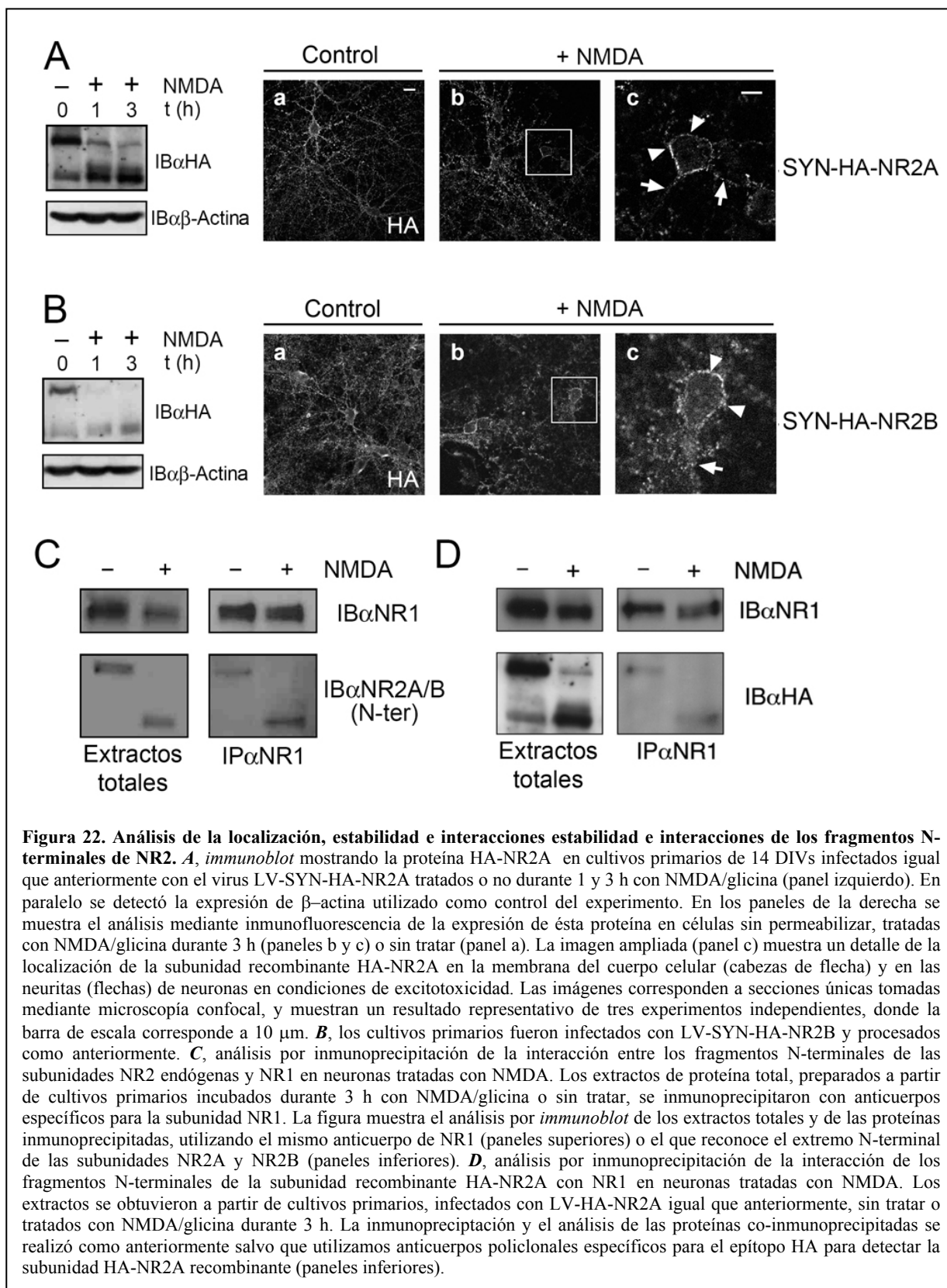


Figura 21. Caracterización de la expresión de las subunidades NR2 recombinantes utilizando lentivirus. **A**, análisis por inmunofluorescencia de cultivos primarios (14 DIVs) doblemente infectados (a 7 DIVs) con los virus LV-SYN-HA-NR2A y LV-SYN-YFP-NR2B. Se muestra la expresión de las proteínas recombinantes, detectadas con anticuerpos específicos para YFP (azul) o HA (rojo) y la de los NR2A endógenas y recombinantes, detectadas con anticuerpos dirigidos contra la región C-terminal de NR2A (verde). Los resultados demuestran la co-localización de la proteína recombinante HA-NR2A con la subunidad NR2A endógena (panel a, amarillo) o con la subunidad recombinante YFP-NR2B (panel b, morado). Las imágenes son secciones únicas obtenidas por microscopía confocal y la barra de escala representa 10 μ m. **B**, inmunofluorescencias mostrando la expresión en membrana de las subunidades recombinantes. Los cultivos neuronales fueron doblemente infectados con el virus LV-SYN-GFP junto con los virus LV-SYN-HA-NR2A (paneles a y b) o LV-SYN-HA-NR2B (paneles c y d). Se realizó un análisis por inmunofluorescencia de células no permeabilizadas utilizando el anticuerpo contra el epítipo HA (rojo, paneles a-d), detectándose la expresión de GFP por fluorescencia directa (paneles a y c). Las imágenes ampliadas muestran, en detalle, la expresión de las subunidades recombinantes con el patrón característico del NMDAR: tinción en la membrana del cuerpo celular (cabezas de flecha) y en las dendritas (flechas) (paneles b y d). El proceso de obtención de las imágenes fue igual que el descrito previamente.

Una vez confirmada la fidelidad del sistema de expresión, caracterizamos la estabilidad y localización de las subunidades NR2 recombinantes en neuronas sometidas a excitotoxicidad. Cultivos neuronales de 7 DIVs fueron infectados con LV-SYN-HA-NR2A (Fig. 22A) o LV-SYN-HA-NR2B (Fig. 22B) y, 7 días después, estimulados o no con NMDA y glicina durante 1 y 3 h. A continuación, se utilizó el anticuerpo dirigido contra el epítipo HA para realizar análisis de *immunoblot* e inmunofluorescencia de células no permeabilizadas. Las células sin tratar expresaron una proteína NR2A recombinante del tamaño esperado, que fue procesada después del tratamiento con NMDA para producir un fragmento de 115 kDa, estable por la duración del experimento (Fig. 22A). En concordancia con estos resultados, no se observaron grandes diferencias entre el nivel de HA-NR2A expresado en la superficie celular de las neuronas tratadas y sin tratar (Fig. 22A, comparar paneles a y b). Aunque el patrón de tinción de los cuerpos celulares no fue modificado por el tratamiento con NMDA, sí se observa la degeneración parcial de las neuritas (comparar Fig. 21B, panel b, y Fig. 22A, panel c). Los resultados obtenidos con la subunidad recombinante HA-NR2B fueron similares (Fig. 22B), aunque sus niveles fueron sistemáticamente más bajos que los de HA-NR2A, y la estabilidad de la proteína truncada más reducida. En conclusión, estos experimentos demuestran, de forma individual, el procesamiento de las dos subunidades NR2 en neuronas tratadas con concentraciones excitotóxicas de NMDA, y la estabilidad y localización en la membrana de la subunidad NR2A truncada y, en menor medida, de NR2B.

Con objeto de empezar a investigar si las formas truncadas de las subunidades NR2 pudieran tener alguna función en la neurona, hemos estudiado si estos fragmentos estables de la membrana continúan interaccionando con las subunidades NR1. Para ello, se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación en cultivos tratados o no con NMDA de las subunidades NR2 endógenas (Fig. 22C), o individualmente de las proteínas recombinantes HA-NR2A (Fig. 22D) o HA-NR2B (datos no mostrados). En estos experimentos se seleccionó un tiempo de tratamiento con NMDA de 3 h, dado que la regulación de NR1 a este tiempo es sólo parcial, en contraste con un procesamiento casi completo de las subunidades NR2 (Fig. 22C, paneles de la izquierda). La inmunoprecipitación con anticuerpos específicos para NR1 confirmó la interacción de esta subunidad con las formas completas de NR2 en las células sin tratar, tal como era de esperar, y demostró la interacción de NR1 con las subunidades NR2 truncadas en las células tratadas con NMDA (Fig. 22C, paneles de la derecha). Una vez demostrada la interacción de las subunidades NR2 endógenas truncadas con NR1, hemos querido estudiar si en dicha interacción participa una o ambas subunidades NR2. Para ello se realizaron experimentos de co-

immunoprecipitación similares a los anteriores, pero de células infectadas con LV-SYN-HA-NR2A y tratadas o no con NMDA (Fig. 22D).



Utilizando el anticuerpo dirigido contra el epítipo HA, el resultado fue similar al obtenido para las subunidades endógenas, demostrando inequívocamente la interacción de la subunidad NR2A truncada con NR1. En el caso de la proteína NR2B, la interacción no pudo establecerse, probablemente debido a los bajos niveles de subunidad HA-NR2B truncada observados en los cultivos tratados con NMDA (datos no mostrados). En conclusión, estos experimentos muestran que la subunidad truncada NR2A, producida por procesamiento dependiente de calpaína tras la sobreestimulación de los NMDARs en neuronas, es estable y capaz de formar hetero-oligómeros con las subunidades NR1 en la membrana celular.

3.11. La isquemia cerebral induce el procesamiento de las subunidades NR2A y NR2B y la proteólisis de PSD-95, en paralelo con la activación de la calpaína.

Los resultados obtenidos *in vivo* demostraron la regulación negativa de ambas subunidades NR2 y PSD-95 asociada a la isquemia cerebral focal transitoria (Fig. 10). Después de la caracterización detallada del mecanismo de regulación de estas proteínas en el modelo *in Vitro*, realizamos experimentos para establecer si un proceso similar tiene lugar en el modelo de isquemia cerebral. Además para estimar las consecuencias patofisiológicas de la regulación de las subunidades NR2 *in vivo*, es importante conocer su cinética. Con estos objetivos analizamos cerebros de ratas sometidos a la oclusión de la AMC seguida de diferentes tiempos de reperusión, comparando extractos de proteínas del área infartada (I) con las regiones correspondientes en el hemisferio contralateral (C) o con animales sham-operated (Sh). Los niveles de las subunidades NR2 fueron caracterizados mediante inmunodetección en filtro con diferentes anticuerpos (Fig. 23A). En este modelo, 1 h de oclusión fue suficiente para inducir una disminución significativa en los niveles de NR2A. Sin embargo, la reperusión potenció significativamente esta regulación, de forma que la proteína fue prácticamente indetectable en cerebros reperfundidos durante 24 h después de la oclusión. Se obtuvieron resultados similares con el anticuerpo dirigido contra la región C-terminal conservada de NR2A/B, mostrando que el procesamiento de todas las subunidades NR2 era prácticamente completo tras 24 h de reperusión. Por otra parte, el anticuerpo dirigido contra la región N-terminal de NR2A/B demuestra la regulación de las subunidades NR2 por procesamiento y, además, la acumulación de formas truncadas de 115 kDa. Resulta muy interesante que dichas subunidades truncadas fueron estables durante, al menos, las primeras 48 h de reperusión tras la oclusión. El análisis de la proteína NSE muestra que el procesamiento de las subunidades NR2A y NR2B es un mecanismo específico y no un efecto general de la isquemia. En conclusión, estos resultados

demuestran que las regiones C-terminales de ambas subunidades NR2 son procesadas muy pronto en el proceso de ischemia, produciéndose formas truncadas que no son degradadas en las 48 h siguientes a la oclusión.

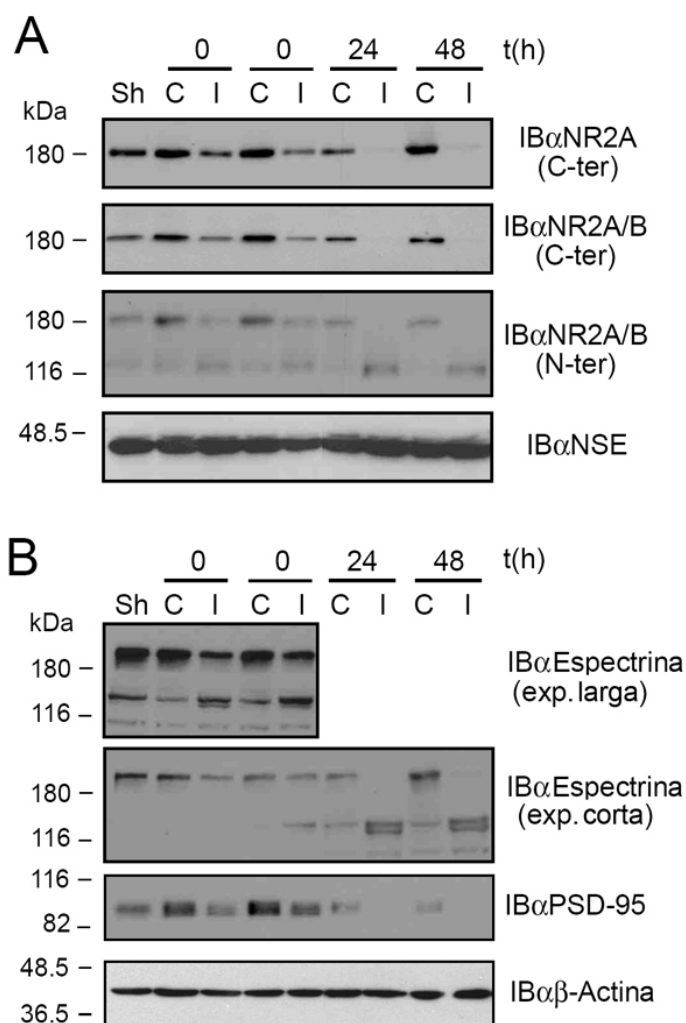


Figura 23. Caracterización del procesamiento de NR2A y NR2B, y la proteólisis de PSD-95 en ischemia cerebral. **A**, análisis por *immunoblot* de los niveles de expresión de las subunidades NR2A (C-terminal) y NR2A/B (C-terminal y N-terminal), y de NSE en extractos proteicos (50 µg) de cerebro de ratas sometidas a oclusión de la AMC, seguida de diferentes tiempos de reperusión. Los extractos corresponden a la región infartada de la corteza (I) y al área correspondiente en el hemisferio contralateral (C). Como control adicional también se usaron extractos de cerebro de animales *sham-operated* (Sh). **B**, análisis por *immunoblot* de los niveles de PSD-95, espectrina y β-actina de animales tratados como anteriormente. Para apreciar la aparición temprana de los fragmentos característicos del procesamiento por calpaína de la espectrina, se muestran dos exposiciones distintas de ese *immunoblot*.

Si teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente en el modelo *in vitro* de excitotoxicidad, y sabiendo que la activación de la calpaína es un evento temprano en ischemia cerebral (Hong et al., 1994a; Hong et al., 1994b), es razonable esperar que esta proteasa sea responsable también *in vivo* del procesamiento proteolítico de las subunidades NR2A y NR2B. Hemos confirmado la activación de la calpaína en el modelo de ischemia cerebral mediante la producción de los fragmentos característicos de espectrina, observando que esta tiene lugar

incluso durante la oclusión, si bien su actividad se incrementa progresivamente durante el periodo de reperusión (Fig. 23B).

En estos experimentos también hemos caracterizado la regulación de PSD-95. Una observación interesante es que los niveles de esta proteína también disminuyen muy tempranamente, con una cinética paralela al procesamiento de las subunidades NR2, y a la activación de la calpaína (Fig. 23B). Los niveles de β -actina, utilizada como control, no fueron modificados por la isquemia (Fig. 23B, panel inferior). En conjunto, los resultados presentados aquí sugieren que la calpaína es responsable del desmantelamiento eficiente y rápido de la estructura de la densidad postsináptica en la región infartada durante la isquemia cerebral. Este proceso afecta no sólo al NMDAR, sino también a sus proteínas asociadas, espectrina, que une los NMDARs al citoesqueleto de actina (Wechsler and Teichberg, 1998), y PSD-95, una proteína de andamiaje de la densidad postsináptica que conecta el NMDAR con vías de señalización y con el citoesqueleto de las neuronas.

Discusión

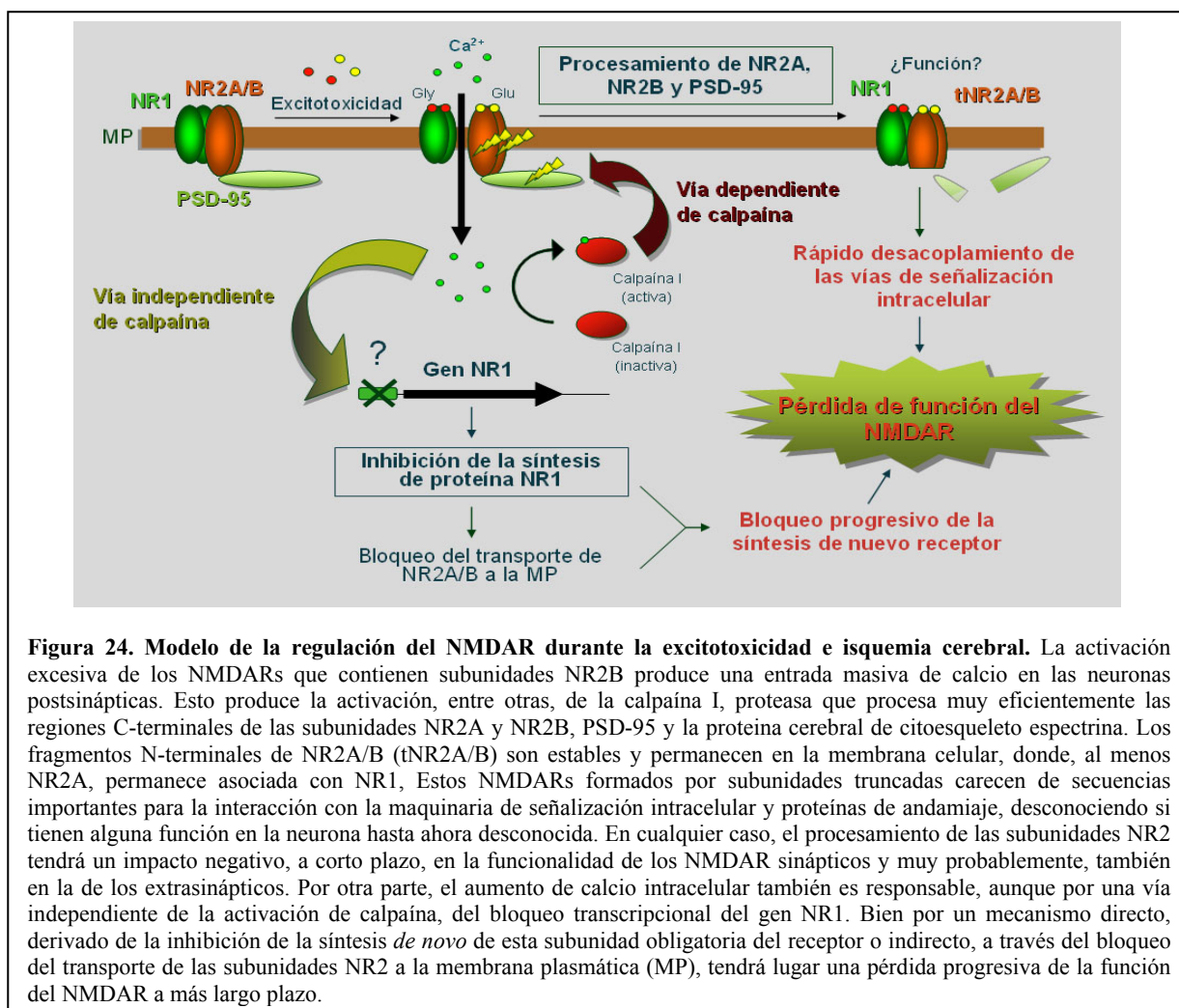
DISCUSIÓN

El trabajo presentado en esta tesis ha permitido la identificación y caracterización en profundidad de nuevos mecanismos de autorregulación del NMDAR, esquematizados en la Figura 24, inducidos en neuronas maduras por la sobre-exposición a su agonista glutamato. Se trata de procesos de regulación negativa que afectan tanto a NR1, subunidad esencial del NMDAR, como a NR2A y NR2B, si bien los mecanismos y cinéticas de regulación son diferentes en ambos casos.

Por una parte, utilizando un modelo celular de excitotoxicidad, hemos observado que la activación del NMDAR con concentraciones elevadas de sus coagonistas NMDA y glicina induce la inhibición rápida y específica del promotor del gen de NR1 y que esta inhibición es estrictamente dependiente del influjo de calcio a través de este receptor (Fig. 15C). La inhibición transcripcional da lugar a una disminución progresiva en los niveles de su mRNA, que afecta a más largo plazo a los niveles de la proteína acumulada (Fig. 11). La cinética de disminución observada para NR1 es compatible con el patrón bifásico previamente descrito para esta proteína (Huh and Wenthold, 1999), con dos poblaciones de vidas medias de 2 y 34 h que corresponden, respectivamente, a las subunidades NR1 no ensambladas en tránsito desde el RE y a las expresadas en la superficie celular formando complejos con las subunidades NR2. Nuestros resultados muestran una cinética inicial de disminución de NR1 rápida que se ralentiza poco tiempo después, sugiriendo que la vida media de la subunidad NR1 de la superficie celular que forma parte de los receptores funcionales no se ve afectada por el tratamiento con NMDA. Además, experimentos realizados con inhibidores específicos también apoyan la idea de que la regulación de NR1 inducida en excitotoxicidad no es debida a mecanismos de endocitosis y/o degradación (datos no mostrados). Hemos descartado que la disminución en los niveles de NR1 sea debida a la muerte celular producida en excitotoxicidad, puesto que 2 h después de la sobrestimulación con NMDA la reducción de la actividad del promotor de NR1 es del 68% (Fig. 15A), frente a una pérdida de viabilidad celular inferior al 18% (Fig. 11D).

La inhibición de la síntesis de NR1, muy probablemente conducirá a la retención de las subunidades NR2 de nueva síntesis en el RE, tal como se ha mostrado en ratones “knock-out” de NR1 (Fukaya et al., 2003). Independientemente de que la maduración y ensamblado de las subunidades NR2 pueda verse afectada o no, una sobreestimulación de los NMDARs producirá

la disminución progresiva de la actividad del receptor, dado que la funcionalidad de éste es absolutamente dependiente de la expresión de hetero-oligómeros NR1/NR2 en la superficie celular (Monyer et al., 1992).



La regulación de la subunidad NR1 es un mecanismo activado irreversiblemente tras una breve exposición a concentraciones excitotóxicas de NMDA (Fig. 12C). Además, tal como muestran los resultados obtenidos con el inhibidor específico ifenprodil, la regulación requiere la sobre-estimulación de NMDARs que contienen subunidades NR2B, es decir, está asociada con vías de señalización activadas por receptores NR1/NR2B o NR1/NR2A/NR2B (Fig. 12A). Como ya se comentó en el apartado de introducción, la estimulación en el proceso de excitotoxicidad, de los NMDARs extrasinápticos, formados principalmente por subunidades NR2B, da lugar a la inhibición de CREB de forma generalizada y dominante, bloqueando la inducción de BDNF y estando acoplada a vías de señalización hacia muerte neuronal (Hardingham et al., 2002). La inactivación de CREB también se ha observado en condiciones de isquemia (Walton and Dragunow, 2000). El requerimiento de subunidades NR2B y de concentraciones excitotóxicas de agonista para la regulación de NR1, sugiere que la sobre-

estimulación de los receptores extrasinápticos tiene un papel fundamental en este mecanismo. Es interesante el hecho de que se han descrito tres CREs en el promotor de NR1 que tienen un papel crítico en la expresión de este gen (Lau et al., 2004). La inhibición de la transcripción de NR1 podría, por tanto, explicarse por el bloqueo de la fosforilación de CREB producido por la estimulación de los NMDARs extrasinápticos. Otra posible explicación de estos resultados sería la reexpresión en excitotoxicidad del represor REST/NRSF y su interacción con los sitios RE-1 en el promotor de NR1. Estos elementos de regulación, como ya se ha comentado previamente, juegan un papel clave en la inducción transcripcional del gen de NR1 durante la diferenciación neuronal, proceso que coincide con la disminución en los niveles de REST/NRSF y de su consecuente interacción con el promotor de NR1 (Bai et al., 2003). Esta hipótesis está apoyada por observaciones previas que muestran un incremento en la expresión de REST/NRSF en las neuronas destinadas a morir durante la isquemia cerebral, lo que produce el bloqueo de la actividad promotora del gen de GluR2, subunidad de los receptores de glutamato tipo AMPA (Calderone et al., 2003). Sería interesante establecer si este represor podría ser responsable también del bloqueo transcripcional de NR1 en nuestros modelos de excitotoxicidad *in vitro* e *in vivo*.

Además de los procesos descritos para NR1, en esta tesis se ha caracterizado un mecanismo diferente de autorregulación de las subunidades NR2 en excitotoxicidad (Fig. 22). En un modelo celular de este proceso, la activación de los NMDARs induce una disminución rápida y específica de los niveles de subunidad NR2A (Fig. 17), que tampoco puede ser explicada por la muerte neuronal. La regulación de NR2A durante la excitotoxicidad es dependiente del influjo de calcio (Fig. 18C). y requiere de la actividad de la calpaína (Fig. 19), proteasa que corta muy eficientemente la región C-terminal produciendo una subunidad truncada estable, carente de las secuencias necesarias para la formación de complejos en la membrana post-sináptica (Husi et al., 2000). Dado que este mecanismo afecta a NR2A, componente fundamental de los NMDARs sinápticos de las neuronas maduras, podría tener un gran impacto en la transmisión sináptica y en la supervivencia neuronal. Los resultados aquí presentados también confirman y extienden observaciones previas, concernientes a un mecanismo similar que afecta a la subunidad NR2B en excitotoxicidad e isquemia, si bien estos trabajos sólo mostraban un procesamiento muy parcial de esta subunidad por calpaína (Simpkins et al., 2003). Por el contrario, nosotros demostramos, un procesamiento extensivo por calpaína del extremo C-terminal de NR2B en modelos de excitotoxicidad *in Vitro* (Fig. 17A) y de isquemia cerebral (Figs. 10 y 23). Dado que NR2B es predominante en regiones extrasinápticas (Li et al., 1998;

Rumbaugh and Vicini, 1999; Tovar and Westbrook, 1999), la función de los NMDARs ubicados fuera de la sinapsis también será afectada por la excitotoxicidad.

Aunque el mecanismo de regulación de las subunidades NR2 es diferente al de NR1, ambos tienen semejanzas en muchos aspectos: está asociado con la activación de NMDARs de composición NR1/NR2B o NR1/NR2A/NR2B, requiere de la entrada de calcio, y las exposiciones breves al agonista, en concentraciones excitotóxicas, son suficientes para reducir los niveles de esta subunidad irreversiblemente (Fig. 18). Probablemente, en parte porque una activación muy breve del NMDAR es suficiente para desencadenar también la inhibición de la síntesis de NR1 (Fig. 12C). La rápida fragmentación de las subunidades NR2 que tiene lugar en condiciones de excitotoxicidad, no interfiere con la regulación de NR1. Además, nuestros resultados muestran que no se requiere la fragmentación de NR2 para que tenga lugar la regulación de NR1, puesto que la inhibición de la calpaína no previene la disminución de los niveles de NR1 inducida por NMDA (Fig. 13B). En cualquier caso, ambos procesos de regulación repercutirán finalmente en una disminución de la expresión de NMDARs funcionales, tanto en localizaciones sinápticas, como extrasinápticas. Las observaciones publicadas (Wu et al., 2005) que muestran la disminución en las corrientes eléctricas mediadas por el flujo de iones a través de los NMDARs tras la exposición a sus agonistas, apoyan nuestras conclusiones.

Los dominios C-terminales intracelulares de las subunidades NR2 son necesarios para la localización y función de los NMDARs, como se ha demostrado en el estudio de ratones genéticamente modificados que expresan receptores carentes de estas secuencias (Mori et al., 1998; Sprengel et al., 1998). Considerando el dramático procesamiento de las regiones C-terminales de las subunidades NR2 que ocurre en excitotoxicidad, era de esperar que se produjese el desacoplamiento de los NMDARs y las proteínas de andamiaje de la PSD, del citoesqueleto y de las vías de señalización que se activan tras la estimulación del NMDAR. Pero, además, hemos revelado que PSD-95, una de las proteínas de andamiaje más importantes de la PSD que interacciona con las subunidades NR2, también es proteolizada muy eficientemente por calpaína durante la excitotoxicidad. Finalmente, está bien caracterizado que la espectrina, una proteína que une las subunidades NR1 y NR2 al citoesqueleto (Wechsler and Teichberg, 1998), también es proteolizada por calpaína en paralelo a las subunidades NR2 y PSD-95. Tiempo atrás ya se había descrito como la estimulación sináptica, a través de los NMDARs y la consecuente activación de la calpaína, podía afectar a la organización de las

sinápsis (Lynch and Baudry, 1987). Todos estos datos, en conjunto, demuestran que la activación de la calpaína durante el proceso de excitotoxicidad afecta profundamente a la organización de la PSD, y sugieren que el dismantelamiento de esta estructura tendrá un gran impacto sobre las funciones acopladas a los NMDARs sinápticos. Añadido al mecanismo anterior que, como hemos visto, ocurre muy tempranamente tras la sobreactivación del NMDAR, la inhibición adicional de la transcripción del gen de NR1, bloqueará a más largo plazo la llegada de nuevos receptores a la membrana. Dada la importancia de los NMDARs sinápticos en la supervivencia neuronal, nosotros proponemos que la autorregulación de los NMDARs inducida por la excitotoxicidad juega un papel fundamental en la degeneración neuronal asociada a estos procesos. Previamente se demostró que se requiere la supervivencia neuronal, la transmisión sináptica mediada por los NMDARs, y que el bloqueo de estos receptores induce apoptosis y empeora procesos de neurodegeneración que tienen lugar en el SNC durante el desarrollo y en el adulto (Ikonomidou et al., 1999; Ikonomidou et al., 2000; Olney et al., 2002). Por otro lado, el enriquecimiento de los estímulos ambientales que aumenta la actividad sináptica, inhibe la apoptosis espontánea en el hipocampo y tiene un efecto neuroprotector (Young et al., 1999). En relación con los NMDARs extrasinápticos, y teniendo en cuenta su papel en la inducción de muerte, es posible suponer un efecto neuroprotector de su regulación en la excitotoxicidad. Sin embargo, esto es poco probable ya que la sobreactivación de los NMDARs durante períodos muy breves, es suficiente para activar irreversiblemente la muerte neuronal.

Hemos estudiado también cual es el destino de los fragmentos de las subunidades NR2 producidos por calpaína. No hemos detectado fragmentos C-terminales con los anticuerpos específicos para estas regiones (anti-NR2A/B), lo que sugiere que probablemente no son estables. Por otro lado, nuestros resultados demuestran la estabilidad de los fragmentos N-terminales de las subunidades NR2 producidas en condiciones de excitotoxicidad (Fig. 17A). La expresión mediante lentivirus de proteínas NR2 recombinantes con secuencias HA en su región N-terminal ha permitido demostrar que la forma trunca de NR2A no sólo es estable, sino que además permanece en la membrana de las neuronas tratadas con NMDA (Fig. 22A) interaccionando con las subunidades NR1 (Fig. 22D). Hasta el momento, desconocemos si estas subunidades truncadas carentes de sus funciones fisiológicas, podrían ser diferentes a las de la proteína nativa. El análisis de la proteína NR2B trunca muestra que es parcialmente estable en la membrana de las neuronas tratadas con NMDA (Fig. 22B), pero no ha permitido establecer su posible interacción con NR1. Dadas las diferencias funcionales asociadas a las

subunidades NR2A y NR2B, será interesante caracterizar en profundidad la distinta estabilidad de sus formas truncadas. En cuanto a PSD-95 hasta el momento no hemos detectado fragmentos estables de la proteína, si bien caracterizar este punto requerirá el uso de otros anticuerpos que reconozcan regiones específicas en su secuencia.

Los experimentos desarrollados *in vivo* utilizando un modelo animal de isquemia cerebral focal transitoria, muestran un mecanismo semejante de autoregulación de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del NMDAR, que tiene lugar en el cerebro adulto en condiciones patológicas. De forma semejante a lo que sucede con el modelo celular, la regulación de las subunidades NR2 en el modelo de isquemia, también es un proceso más rápido que el de NR1. La disminución en los niveles de NR2A y NR2B ya es detectable tras el periodo de 1 h de oclusión, sin necesidad de que tenga lugar la repercusión del tejido, mientras que la subunidad NR1 empieza a desaparecer tras 2 h de reperusión (Fig. 16). La similitud entre ambos modelos era previsible ya que la excitotoxicidad es un evento clave en la muerte y degeneración neuronal que tienen lugar en diferentes patologías, incluidas la hipoxia, la isquemia y varias enfermedades neurodegenerativas (Choi, 1988).

La regulación de NR1 en la región de isquemia es por control transcripcional, observándose una disminución muy significativa en los niveles de su mRNA tras 2 h de reperusión (Fig 16B). La regulación transcripcional es un mecanismo que juega un papel importante en la patofisiología del cerebro isquémico, existiendo múltiples ejemplos de genes inhibidos o inducidos en la corteza cerebral y en el estriado de ratas sometidas a isquemia focal transitoria (Kim et al., 2004). El resultado de la temprana inhibición de la transcripción de NR1 en isquemia es la pérdida progresiva de esta subunidad, que es muy difícilmente detectable después de 24 h de reperusión. La desaparición de NR1 en isquemia determina que no existan NMDARs disponibles para la señalización de vías de supervivencia, y podría tener un papel importante en la muerte neuronal, tal y como se ha sugerido para los receptores GluR2 (Calderone et al., 2003).

Los datos presentados en esta Tesis, obtenidos en modelos de excitotoxicidad *in vitro* e *in vivo*, muestran inequívocamente que la proteólisis de esta subunidad NR2A por calpaína, tiene lugar en neuronas maduras. En el modelo celular de excitotoxicidad, la cinética ligeramente más lenta de regulación de NR2A observada en neuronas de 21 DIVs, comparada con los cultivos de 14 DIVs, podría explicar los resultados de Dong et al. (2004), mostrando que la proteólisis de NR2A no es significativa en neuronas maduras, ya que en sus

experimentos únicamente se realizaron exposiciones muy breves al agonista (30 min.). Estos autores sugirieron que la interacción con PSD-95 podría proteger a esta subunidad de la acción de la calpaína. Ciertamente, los elevados niveles de PSD-95 en los cultivos de 21 DIVs, podrían ralentizar inicialmente el procesamiento de NR2A inducido por NMDA. Sin embargo, nuestros datos muestran que este efecto protector no es posible pasados unos minutos, ya que PSD-95 también es rápidamente degradado en condiciones de excitotoxicidad.

En animales sacrificados inmediatamente después de la oclusión, como dijimos, ya es evidente la disminución en los niveles de las proteínas NR2A y NR2B y la aparición de subunidades truncadas estables durante, al menos, 48 h después de la reperusión. Nuestros estudios muestran que los niveles de mRNA de NR2A no se modifican en el hemisferio ipsilateral de ratas sometidas a oclusión de la ACM y 4 h de reperusión, sugiriendo fuertemente un mecanismo de regulación postranscripcional (Fig. 16B). Las calpaínas son mediadores muy importantes en procesos patológicos y en situaciones de toxicidad celular (Vanderklish and Bahr, 2000), siendo activadas por ejemplo en situaciones de isquemia cerebral, (Hong et al., 1994a; Hong et al., 1994b; Siman and Noszek, 1988). Para entender los procesos de degeneración neuronal asociados con estas patologías, es importante conocer cuales son los sustratos de la calpaína, y cómo se afectan sus funciones a consecuencia de su proteólisis. Por ejemplo, uno de estos sustratos es el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana NCX (Bano et al., 2005), el sistema de exportación de Ca^{2+} más importante en la neurona. La inactivación de esta proteína a consecuencia del procesamiento por calpaína, tiene un papel relevante en el incremento secundario de Ca^{2+} intracelular y en la consecuente muerte neuronal durante la excitotoxicidad (Bano et al., 2005). En el modelo caracterizado en esta tesis, hemos observado que la activación de la calpaína es muy temprana, observándose incluso durante la oclusión de la ACM, y existe una correlación muy buena entre su actuación y el procesamiento de PSD-95 y las subunidades NR2. Estos resultados sugieren fuertemente que esta proteasa es responsable de la proteólisis coordinada de NR2A, NR2B, y sus proteínas asociadas PSD-95 y espectrina, en la región infartada durante la isquemia cerebral. El papel neuroprotector que tiene la inhibición de la calpaína en un modelo de isquemia cerebral focal transitoria (Hong et al., 1994a) confirma la importancia de los sustratos de esta proteasa en la supervivencia neuronal. En el caso de las subunidades NR2, queremos utilizar el sistema de expresión lentiviral desarrollado en esta Tesis para caracterizar directamente y en detalle su contribución a la supervivencia neuronal, en condiciones normales y de excitotoxicidad. Para

ello, mediremos la viabilidad de las neuronas que sobre-expresan esta subunidad o en las que se bloquea su expresión a través de RNAs de interferencia.

Estos nuevos mecanismos de regulación de las proteínas NR1 y NR2 inducidos por excitotoxicidad podrían ser fundamentales en la muerte neuronal, que ocurre en otras patologías del SNC distintas de la isquemia cerebral. La pérdida de la función de los NMDARs sinápticos podría formar parte de una respuesta general de las neuronas al daño, dirigida a eliminar a aquellas que han sido severamente dañadas. En relación a esta hipótesis, se ha observado una pérdida sostenida de la función de los NMDARs en ratones sometidos a traumatismos cerebrales agudos, que tiene lugar tras una corta hiperactivación (<1h) (Biegon et al., 2004). Esta disminución en la función de los NMDARs podría contribuir a las alteraciones cognitivas y neurológicas producidas en los pacientes con patologías traumáticas o isquémicas, así como explicar el fracaso de los ensayos clínicos con antagonistas competitivos de los NMDARs. Estas drogas compiten con la glicina y el glutamato por sus sitios de unión en el receptor y no son selectivas, bloqueando tanto la activación fisiológica como la patológica del NMDAR. No es de extrañar, por tanto, que estos fármacos tengan efectos secundarios intolerables para su utilización clínica, tales como somnolencia, alucinaciones e incluso coma. En el caso de la isquemia y el traumatismo cerebral agudo, se iniciaron sin embargo ensayos clínicos, a pesar de que el tratamiento con los antagonistas del NMDAR no produjeron un efecto neuroprotector significativo en los modelos animales cuando se aplicaron posteriormente al daño cerebral (Ikonomidou and Turski, 2002). Los resultados presentados en este trabajo sugieren que las neuronas supervivientes al daño isquémico muy probablemente tienen disminuida la función de los NMDARs sinápticos, fundamentales para la supervivencia neuronal, y su supresión ulterior por los antagonistas competitivos, nada más agravaría esta situación, facilitando en lugar de bloqueando la muerte neuronal.

De cualquier modo, el NMDAR sigue siendo todavía una diana muy prometedora para el desarrollo de fármacos dirigidos al tratamiento de las enfermedades neurológicas. Entre las nuevas drogas la memantina ha generado grandes expectativas. Es un bloqueante de baja afinidad, que se une al canal activado de los NMDARs, y que ha sido aprobado recientemente por los órganos más competentes de la Unión Europea y los Estados Unidos, para el tratamiento de la demencia. Los ensayos clínicos en fase 3 realizados con este medicamento han demostrado que es efectivo para el tratamiento de pacientes con grados moderados o severos de la enfermedad de Alzheimer, donde la tolerancia clínica del medicamento es buena

(Chen and Lipton, 2006). Actualmente, se está probando la memantina para el tratamiento de otras afecciones neurológicas, como son otros tipos diferentes de demencia, y se han obtenido también resultados prometedores en modelos animales de isquemia. En el futuro, el desarrollo de estos fármacos o el diseño de nuevas drogas para el tratamiento de procesos agudos o crónicos en los que participa la excitotoxicidad, debería de tener en cuenta la autorregulación de los NMDARs descrita en este trabajo.

En esta tesis también se han desarrollado y caracterizado vectores lentivirales que permiten la expresión de proteínas recombinantes de forma muy eficiente, específica y regulable en neuronas. Para ello, en primer lugar hemos desarrollado un sistema de expresión dual y específico que hemos puesto a prueba, a través del vector SYN-DsRed-SYN-GFP.

La comparación de los niveles de las proteínas DsRed y GFP, obtenidos en células infectadas con el vector dual o con cada uno de los vectores SYN-DsRED o SYN-GFP, muestra la ausencia de efectos posicionales sobre la eficiencia de expresión en el sistema de dos promotores (Fig. 6B). El análisis por inmunofluorescencia permite, además, demostrar la expresión con elevada eficiencia de las dos unidades génicas en prácticamente todas las neuronas presentes en los cultivos primarios, y su ausencia de las células gliales (Fig. 7). Este sistema es novedoso porque utiliza dos promotores con especificidad neuronal para expresar dos proteínas simultáneamente en la misma célula con un único vector. Anteriormente el desarrollo de vectores de expresión con dos o más genes en una única unidad de transcripción (Davies and Kaufman, 1992; Martinez-Salas, 1999; Mountford and Smith, 1995) mediante utilización de elementos IRES (*internal ribosome entry site*) que permiten la interacción de los ribosomas con regiones de iniciación de la traducción en posiciones internas en el mRNA. Estos sistemas de expresión bicistrónica son especialmente ventajosos en el caso de los vectores retrovirales, cuya capacidad de clonaje está limitada (Adam et al., 1991; Morgan et al., 1992; Ramesh et al., 1996). Por el contrario, los vectores lentivirales tienen una capacidad relativamente elevada para empaquetar moléculas de RNA (Azzouz et al., 2002) que permite su utilización para el desarrollo de sistemas duales controlados por dos promotores. Por otra parte, la utilización de los elementos IRES tiene desventajas: como, por ejemplo, que la expresión del segundo gen, dependiente de los elementos IRES, es a menudo muy inferior a la del primero (Hennecke et al., 2001; Mizuguchi et al., 2000), dependiente de las secuencias *cap* (*c-Cbl associated-protein*). Otra desventaja es que no es posible la expresión regulable de

genes con estos vectores por sí solos, siendo necesaria la utilización de vectores adicionales que aportan otros elementos necesarios.

Los resultados obtenidos con el vector lentiviral dual nos han permitido plantear el desarrollo de un sistema de expresión regulada, donde la expresión del transactivador rTA queda bajo el control de un promotor de sinapsina que aporta la especificidad neuronal, y un promotor regulable por tetraciclina (TRE) controla la expresión del gen exógeno. Sistemas de expresión regulable similares a éstos han sido utilizados anteriormente con éxito (Haack et al., 2004; Kafri et al., 2000), aunque nunca con especificidad neuronal. Los resultados de este trabajo demuestran que el sistema regulable desarrollado tiene especificidad neuronal en contraposición a vectores equivalentes utilizando un promotor de SV40 en los que la expresión del gen exógeno se induce fundamentalmente en las células gliales (Fig 8). Al mismo tiempo, hemos determinado que el bloqueo transcripcional ejercido por la doxociclina en nuestro sistema es muy eficiente, no siendo posible detectar por *immunoblot* la expresión de GFP en neuronas infectadas con el virus LV-SYN-tTA-TRE-GFP y tratadas con este antibiótico. Sin embargo, la expresión GFP se induce en ausencia de doxociclina (Fig 8B) siendo detectable por *immunoblot* a partir de los cuatro días de infección de los cultivos (Fig 9A). Además, la expresión del gen exógeno no sólo es inducible sino también reversible (Fig 9B).

Los dos tipos de sistemas de expresión desarrollados tienen un gran potencial para el estudio de la función de genes en el SNC. Así, por ejemplo, hemos generado vectores que expresan específicamente subunidades NR2A y NR2B recombinantes con epítopos HA en sus regiones N-terminales en las neuronas de los cultivos primarios. Hemos podido comprobar que las subunidades recombinantes son modificadas y transportadas a la membrana plasmática correctamente (Fig. 21), y que se reproduce fielmente en ellas la regulación inducida por el tratamiento con NMDA (Fig 22). Su expresión ha sido clave en la caracterización de forma individual del proceso de regulación para cada una de las subunidades NR2 por inmunofluorescencia, difícil de abordar por la falta de anticuerpos específicos dirigidos contra sus regiones N-terminales. En el futuro, los vectores lentivirales serán una herramienta fundamental en neurociencia y otras disciplinas, sobre todo teniendo en cuenta que es perfectamente posible la generación de animales transgénicos mediante su uso (Lois et al., 2002; Scott and Lois, 2005).

Conclusiones

CONCLUSIONES

- 1- Las subunidades NR1 y NR2(A/B) son reguladas negativamente de forma rápida, eficiente e irreversible por la sobreactivación de los NMDARs en modelos de isquemia cerebral transtoria y de excitotoxicidad celular.
- 2- La regulación de las subunidades es estrictamente dependiente de la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular y de la activación de NMDARs que contienen subunidades NR2B.
- 3- La regulación de NR1 en excitotoxicidad se produce por inhibición transcripcional mediada por la región promotora 5' proximal.
- 4- En el caso de NR2A y NR2B, las subunidades son eficientemente procesadas por calpaína, dando lugar a fragmentos N-terminales de 115 kDa.
- 5- Las subunidades NR2 truncadas son estables en la membrana celular durante horas donde, en el caso de NR2A, permanecen interaccionando con NR1.
- 6- La proteína de andamiaje PSD-95 también es procesada de forma extensiva por calpaína en excitotoxicidad e isquemia cerebral.
- 7- La regulación de las subunidades del receptor y de PSD-95 tiene lugar en cultivos neuronales de diferentes tiempos de maduración *in vitro*.
- 8- La expresión de dos proteínas recombinantes, mediante el uso de dos promotores de sinapsina humana en un mismo vector lentiviral, es muy eficiente y presenta especificidad neuronal.
- 9- Las subunidades NR2 recombinantes expresadas en neuronas utilizando estos vectores lentivirales son reguladas en excitotoxicidad de forma análoga a las subunidades endógenas.
- 10- La combinación del promotor de sinapsina, dirigiendo la expresión del transactivador tTA, con la incorporación de un segundo promotor regulable en el mismo vector lentiviral, permite el desarrollo de sistemas inducibles de gran eficiencia con especificidad neuronal.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, M. A., Ramesh, N., Miller, A. D., and Osborne, W. R. (1991). Internal initiation of translation in retroviral vectors carrying picornavirus 5' nontranslated regions. *J Virol* 65, 4985-4990.
- Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., and Mizuno, N. (1994). Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol* 347, 150-160.
- Arora, A. S., de Groen, P., Emori, Y., and Gores, G. J. (1996). A cascade of degradative hydrolase activity contributes to hepatocyte necrosis during anoxia. *Am J Physiol* 270, G238-245.
- Azzouz, M., Martin-Rendon, E., Barber, R. D., Mitrophanous, K. A., Carter, E. E., Rohll, J. B., Kingsman, S. M., Kingsman, A. J., and Mazarakis, N. D. (2002). Multicistronic lentiviral vector-mediated striatal gene transfer of aromatic L-amino acid decarboxylase, tyrosine hydroxylase, and GTP cyclohydrolase I induces sustained transgene expression, dopamine production, and functional improvement in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 22, 10302-10312.
- Bai, G., and Kusiak, J. W. (1995). Functional analysis of the proximal 5'-flanking region of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit gene, NMDAR1. *J Biol Chem* 270, 7737-7744.
- Bai, G., and Kusiak, J. W. (1997). Nerve growth factor up-regulates the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 promoter in PC12 cells. *J Biol Chem* 272, 5936-5942.
- Bai, G., Zhuang, Z., Liu, A., Chai, Y., and Hoffman, P. W. (2003). The role of the RE1 element in activation of the NR1 promoter during neuronal differentiation. *J Neurochem* 86, 992-1005.
- Bano, D., Young, K. W., Guerin, C. J., Lefevre, R., Rothwell, N. J., Naldini, L., Rizzuto, R., Carafoli, E., and Nicotera, P. (2005). Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell* 120, 275-285.
- Bi, X., Rong, Y., Chen, J., Dang, S., Wang, Z., and Baudry, M. (1998). Calpain-mediated regulation of NMDA receptor structure and function. *Brain Res* 790, 245-253.
- Bibel, M., and Barde, Y. A. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14, 2919-2937.
- Biegon, A., Fry, P. A., Paden, C. M., Alexandrovich, A., Tsenter, J., and Shohami, E. (2004). Dynamic changes in N-methyl-D-aspartate receptors after closed head injury in mice: Implications for treatment of neurological and cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5117-5122.
- Bigge, C. F. (1999). Ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Chem Biol* 3, 441-447.
- Brenman, J. E., Christopherson, K. S., Craven, S. E., McGee, A. W., and Brecht, D. S. (1996). Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J Neurosci* 16, 7407-7415.
- Brun, S., Faucon-Biguët, N., and Mallet, J. (2003). Optimization of transgene expression at the posttranscriptional level in neural cells: implications for gene therapy. *Mol Ther* 7, 782-789.

- Calderone, A., Jover, T., Noh, K. M., Tanaka, H., Yokota, H., Lin, Y., Grooms, S. Y., Regis, R., Bennett, M. V., and Zukin, R. S. (2003). Ischemic insults derepress the gene silencer REST in neurons destined to die. *J Neurosci* 23, 2112-2121.
- Ciabarra, A. M., Sullivan, J. M., Gahn, L. G., Pecht, G., Heinemann, S., and Sevarino, K. A. (1995). Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci* 15, 6498-6508.
- Collingridge, G. (1987). Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory. *Nature* 330, 604-605.
- Cull-Candy, S., Brickley, S., and Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11, 327-335.
- Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., *et al.* (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415, 793-798.
- Chen, H. S., and Lipton, S. A. (2006). The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* 97, 1611-1626.
- Chen, S. T., Hsu, C. Y., Hogan, E. L., Maricq, H., and Balentine, J. D. (1986). A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17, 738-743.
- Choi, D. W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634.
- Choi, D. W. (1992). Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23, 1261-1276.
- Choi, D. W., and Rothman, S. M. (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13, 171-182.
- Das, S., Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Takasu, M., Crandall, J. E., Dikkes, P., Conner, D. A., Rayudu, P. V., Cheung, W., *et al.* (1998). Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* 393, 377-381.
- Davies, M. V., and Kaufman, R. J. (1992). Internal translation initiation in the design of improved expression vectors. *Curr Opin Biotechnol* 3, 512-517.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51, 7-61.
- Donello, J. E., Loeb, J. E., and Hope, T. J. (1998). Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* 72, 5085-5092.
- Dong, Y. N., Waxman, E. A., and Lynch, D. R. (2004). Interactions of postsynaptic density-95 and the NMDA receptor 2 subunit control calpain-mediated cleavage of the NMDA receptor. *J Neurosci* 24, 11035-11045.
- Dong, Y. N., Wu, H. Y., Hsu, F. C., Coulter, D. A., and Lynch, D. R. (2006). Developmental and cell-selective variations in N-methyl-D-aspartate receptor degradation by calpain. *J Neurochem* 99, 206-217.
- Ehlers, M. D., Fung, E. T., O'Brien, R. J., and Huganir, R. L. (1998). Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR1 with neuronal intermediate filaments. *J Neurosci* 18, 720-730.
- Ehlers, M. D., Zhang, S., Bernhardt, J. P., and Huganir, R. L. (1996). Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 84, 745-755.

- Endres, M., Namura, S., Shimizu-Sasamata, M., Waeber, C., Zhang, L., Gomez-Isla, T., Hyman, B. T., and Moskowitz, M. A. (1998). Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab* 18, 238-247.
- Filipkowski, R. K., Hetman, M., Kaminska, B., and Kaczmarek, L. (1994). DNA fragmentation in rat brain after intraperitoneal administration of kainate. *Neuroreport* 5, 1538-1540.
- Forrest, D., Yuzaki, M., Soares, H. D., Ng, L., Luk, D. C., Sheng, M., Stewart, C. L., Morgan, J. I., Connor, J. A., and Curran, T. (1994). Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* 13, 325-338.
- Fukaya, M., Kato, A., Lovett, C., Tonegawa, S., and Watanabe, M. (2003). Retention of NMDA receptor NR2 subunits in the lumen of endoplasmic reticulum in targeted NR1 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4855-4860.
- Glover, C. P., Bienemann, A. S., Heywood, D. J., Cosgrave, A. S., and Uney, J. B. (2002). Adenoviral-mediated, high-level, cell-specific transgene expression: a SYN1-WPRE cassette mediates increased transgene expression with no loss of neuron specificity. *Mol Ther* 5, 509-516.
- Guttmann, R. P., Sokol, S., Baker, D. L., Simpkins, K. L., Dong, Y., and Lynch, D. R. (2002). Proteolysis of the N-methyl-D-aspartate receptor by calpain in situ. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 1023-1030.
- Haack, K., Cockrell, A. S., Ma, H., Israeli, D., Ho, S. N., McCown, T. J., and Kafri, T. (2004). Transactivator and structurally optimized inducible lentiviral vectors. *Mol Ther* 10, 585-596.
- Hahn, C. M., Kleinholz, H., Koester, M. P., Grieser, S., Thelen, K., and Pollerberg, G. E. (2005). Role of cyclin-dependent kinase 5 and its activator P35 in local axon and growth cone stabilization. *Neuroscience* 134, 449-465.
- Hall, R. A., and Soderling, T. R. (1997). Differential surface expression and phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1 and NR2 in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* 272, 4135-4140.
- Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., and Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5, 405-414.
- Hartley, D. M., Kurth, M. C., Bjerkness, L., Weiss, J. H., and Choi, D. W. (1993). Glutamate receptor-induced 45Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J Neurosci* 13, 1993-2000.
- Hawkins, L. M., Prybylowski, K., Chang, K., Moussan, C., Stephenson, F. A., and Wenthold, R. J. (2004). Export from the endoplasmic reticulum of assembled N-methyl-D-aspartic acid receptors is controlled by a motif in the c terminus of the NR2 subunit. *J Biol Chem* 279, 28903-28910.
- Hennecke, M., Kwissa, M., Metzger, K., Oumard, A., Kroger, A., Schirmbeck, R., Reimann, J., and Hauser, H. (2001). Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 29, 3327-3334.
- Hironaka, K., Umemori, H., Tezuka, T., Mishina, M., and Yamamoto, T. (2000). The protein-tyrosine phosphatase PTPMEG interacts with glutamate receptor delta 2 and epsilon subunits. *J Biol Chem* 275, 16167-16173.

- Hollmann, M., and Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17, 31-108.
- Hong, S. C., Goto, Y., Lanzino, G., Soleau, S., Kassell, N. F., and Lee, K. S. (1994a). Neuroprotection with a calpain inhibitor in a model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 25, 663-669.
- Hong, S. C., Lanzino, G., Goto, Y., Kang, S. K., Schottler, F., Kassell, N. F., and Lee, K. S. (1994b). Calcium-activated proteolysis in rat neocortex induced by transient focal ischemia. *Brain Res* 661, 43-50.
- Hossmann, K. A. (1999). The hypoxic brain. Insights from ischemia research. *Adv Exp Med Biol* 474, 155-169.
- Huh, K. H., and Wenthold, R. J. (1999). Turnover analysis of glutamate receptors identifies a rapidly degraded pool of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit, NR1, in cultured cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 274, 151-157.
- Husi, H., Ward, M. A., Choudhary, J. S., Blackstock, W. P., and Grant, S. G. (2000). Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci* 3, 661-669.
- Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vockler, J., Dikranian, K., Tenkova, T. I., Stefovskaja, V., Turski, L., and Olney, J. W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283, 70-74.
- Ikonomidou, C., Stefovskaja, V., and Turski, L. (2000). Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12885-12890.
- Ikonomidou, C., and Turski, L. (2002). Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol* 1, 383-386.
- Ishii, T., Moriyoshi, K., Sugihara, H., Sakurada, K., Kadotani, H., Yokoi, M., Akazawa, C., Shigemoto, R., Mizuno, N., Masu, M., and et al. (1993). Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* 268, 2836-2843.
- Ito, I., Sakimura, K., Mishina, M., and Sugiyama, H. (1996). Age-dependent reduction of hippocampal LTP in mice lacking N-methyl-D-aspartate receptor epsilon 1 subunit. *Neurosci Lett* 203, 69-71.
- Iwakuma, T., Cui, Y., and Chang, L. J. (1999). Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology* 261, 120-132.
- Kafri, T., van Praag, H., Gage, F. H., and Verma, I. M. (2000). Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Mol Ther* 1, 516-521.
- Kemp, J. A., and McKernan, R. M. (2002). NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci* 5 Suppl, 1039-1042.
- Kesavapany, S., Amin, N., Zheng, Y. L., Nijhara, R., Jaffe, H., Sihag, R., Gutkind, J. S., Takahashi, S., Kulkarni, A., Grant, P., and Pant, H. C. (2004). p35/cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of ras guanine nucleotide releasing factor 2 (RasGRF2) mediates Rac-dependent Extracellular Signal-regulated kinase 1/2 activity, altering RasGRF2 and microtubule-associated protein 1b distribution in neurons. *J Neurosci* 24, 4421-4431.
- Kim, E., and Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5, 771-781.

- Kim, J. B., Piao, C. S., Lee, K. W., Han, P. L., Ahn, J. I., Lee, Y. S., and Lee, J. K. (2004). Delayed genomic responses to transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurochem* 89, 1271-1282.
- Kiyama, Y., Manabe, T., Sakimura, K., Kawakami, F., Mori, H., and Mishina, M. (1998). Increased thresholds for long-term potentiation and contextual learning in mice lacking the NMDA-type glutamate receptor epsilon1 subunit. *J Neurosci* 18, 6704-6712.
- Koh, J. Y., and Choi, D. W. (1988). Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by excitotoxins: differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. *J Neurosci* 8, 2153-2163.
- Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B., and Seeburg, P. H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269, 1737-1740.
- Krainc, D., Bai, G., Okamoto, S., Carles, M., Kusiak, J. W., Brent, R. N., and Lipton, S. A. (1998). Synergistic activation of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 promoter by myocyte enhancer factor 2C and Sp1. *J Biol Chem* 273, 26218-26224.
- Kreutz, M. R., Bockers, T. M., Bockmann, J., Seidenbecher, C. I., Kracht, B., Vorwerk, C. K., Weise, J., and Sabel, B. A. (1998). Axonal injury alters alternative splicing of the retinal NR1 receptor: the preferential expression of the NR1b isoforms is crucial for retinal ganglion cell survival. *J Neurosci* 18, 8278-8291.
- Kugler, S., Meyn, L., Holzmüller, H., Gerhardt, E., Isenmann, S., Schulz, J. B., and Bahr, M. (2001). Neuron-specific expression of therapeutic proteins: evaluation of different cellular promoters in recombinant adenoviral vectors. *Mol Cell Neurosci* 17, 78-96.
- Kuner, T., Wollmuth, L. P., Karlin, A., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1996). Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* 17, 343-352.
- Kutsuwada, T., Kashiwabuchi, N., Mori, H., Sakimura, K., Kushiya, E., Araki, K., Meguro, H., Masaki, H., Kumanishi, T., Arakawa, M., and et al. (1992). Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 358, 36-41.
- Kutsuwada, T., Sakimura, K., Manabe, T., Takayama, C., Katakura, N., Kushiya, E., Natsume, R., Watanabe, M., Inoue, Y., Yagi, T., et al. (1996). Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice. *Neuron* 16, 333-344.
- Lau, G. C., Saha, S., Faris, R., and Russek, S. J. (2004). Up-regulation of NMDAR1 subunit gene expression in cortical neurons via a PKA-dependent pathway. *J Neurochem* 88, 564-575.
- Lau, L. F., and Huganir, R. L. (1995). Differential tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem* 270, 20036-20041.
- Laurie, D. J., and Seeburg, P. H. (1994). Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J Neurosci* 14, 3180-3194.
- Lee, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M., and Tsai, L. H. (2000). Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405, 360-364.
- Leonard, A. S., and Hell, J. W. (1997). Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites. *J Biol Chem* 272, 12107-12115.

- Li, B., Chen, N., Luo, T., Otsu, Y., Murphy, T. H., and Raymond, L. A. (2002). Differential regulation of synaptic and extra-synaptic NMDA receptors. *Nat Neurosci* 5, 833-834.
- Li, J. H., Wang, Y. H., Wolfe, B. B., Krueger, K. E., Corsi, L., Stocca, G., and Vicini, S. (1998). Developmental changes in localization of NMDA receptor subunits in primary cultures of cortical neurons. *Eur J Neurosci* 10, 1704-1715.
- Linnik, M. D., Zobrist, R. H., and Hatfield, M. D. (1993). Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 24, 2002-2008; discussion 2008-2009.
- Liu, A., Hoffman, P. W., Lu, W., and Bai, G. (2004). NF-kappaB site interacts with Sp factors and up-regulates the NR1 promoter during neuronal differentiation. *J Biol Chem* 279, 17449-17458.
- Liu, A., Zhuang, Z., Hoffman, P. W., and Bai, G. (2003). Functional analysis of the rat N-methyl-D-aspartate receptor 2A promoter: multiple transcription starts points, positive regulation by Sp factors, and translational regulation. *J Biol Chem* 278, 26423-26434.
- Liu, T. H., Beckman, J. S., Freeman, B. A., Hogan, E. L., and Hsu, C. Y. (1989). Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase and catalase reduce ischemic brain injury. *Am J Physiol* 256, H589-593.
- Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J., and Baltimore, D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295, 868-872.
- Lunyak, V. V., and Rosenfeld, M. G. (2005). No rest for REST: REST/NRSF regulation of neurogenesis. *Cell* 121, 499-501.
- Lynch, G., and Baudry, M. (1987). Brain spectrin, calpain and long-term changes in synaptic efficacy. *Brain Res Bull* 18, 809-815.
- MacManus, J. P., Buchan, A. M., Hill, I. E., Rasquinha, I., and Preston, E. (1993). Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci Lett* 164, 89-92.
- Mao, X., Moerman, A. M., and Barger, S. W. (2002). Neuronal kappa B-binding factors consist of Sp1-related proteins. Functional implications for autoregulation of N-methyl-D-aspartate receptor-1 expression. *J Biol Chem* 277, 44911-44919.
- Martinez-Salas, E. (1999). Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr Opin Biotechnol* 10, 458-464.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L., and Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309, 261-263.
- Meldrum, B. S. (1993). Excitotoxicity and selective neuronal loss in epilepsy. *Brain Pathol* 3, 405-412.
- Michaelis, E. K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol* 54, 369-415.
- Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., and Verma, I. M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72, 8150-8157.
- Mizuguchi, H., Xu, Z., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., and Hayakawa, T. (2000). IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther* 1, 376-382.

- Mizuta, I., Katayama, M., Watanabe, M., Mishina, M., and Ishii, K. (1998). Developmental expression of NMDA receptor subunits and the emergence of glutamate neurotoxicity in primary cultures of murine cerebral cortical neurons. *Cell Mol Life Sci* 54, 721-725.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529-540.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1992). Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256, 1217-1221.
- Moon, I. S., Apperson, M. L., and Kennedy, M. B. (1994). The major tyrosine-phosphorylated protein in the postsynaptic density fraction is N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3954-3958.
- Morgan, R. A., Couture, L., Elroy-Stein, O., Ragheb, J., Moss, B., and Anderson, W. F. (1992). Retroviral vectors containing putative internal ribosome entry sites: development of a polycistronic gene transfer system and applications to human gene therapy. *Nucleic Acids Res* 20, 1293-1299.
- Mori, H., Manabe, T., Watanabe, M., Satoh, Y., Suzuki, N., Toki, S., Nakamura, K., Yagi, T., Kushiya, E., Takahashi, T., *et al.* (1998). Role of the carboxy-terminal region of the GluR epsilon2 subunit in synaptic localization of the NMDA receptor channel. *Neuron* 21, 571-580.
- Mori, H., and Mishina, M. (1995). Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34, 1219-1237.
- Mountford, P. S., and Smith, A. G. (1995). Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis. *Trends Genet* 11, 179-184.
- Mu, Y., Otsuka, T., Horton, A. C., Scott, D. B., and Ehlers, M. D. (2003). Activity-dependent mRNA splicing controls ER export and synaptic delivery of NMDA receptors. *Neuron* 40, 581-594.
- Nakagawa, T., Feliu-Mojer, M. I., Wulf, P., Lois, C., Sheng, M., and Hoogenraad, C. C. (2006). Generation of lentiviral transgenic rats expressing glutamate receptor interacting protein 1 (GRIP1) in brain, spinal cord and testis. *J Neurosci Methods* 152, 1-9.
- Nakazawa, T., Komai, S., Tezuka, T., Hisatsune, C., Umemori, H., Semba, K., Mishina, M., Manabe, T., and Yamamoto, T. (2001). Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR epsilon 2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 276, 693-699.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.
- Nicholson, D. W., and Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22, 299-306.
- Niethammer, M., Valtschanoff, J. G., Kapoor, T. M., Allison, D. W., Weinberg, R. J., Craig, A. M., and Sheng, M. (1998). CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90. *Neuron* 20, 693-707.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462-465.

- Okabe, S., Miwa, A., and Okado, H. (1999). Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. *J Neurosci* 19, 7781-7792.
- Okamoto, S., Sherman, K., Bai, G., and Lipton, S. A. (2002). Effect of the ubiquitous transcription factors, SP1 and MAZ, on NMDA receptor subunit type 1 (NR1) expression during neuronal differentiation. *Brain Res Mol Brain Res* 107, 89-96.
- Olney, J. W. (1986). Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. *Adv Exp Med Biol* 203, 631-645.
- Olney, J. W., Wozniak, D. F., Jevtovic-Todorovic, V., Farber, N. B., Bittigau, P., and Ikonomidou, C. (2002). Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Brain Pathol* 12, 488-498.
- Paas, Y. (1998). The macro- and microarchitectures of the ligand-binding domain of glutamate receptors. *Trends Neurosci* 21, 117-125.
- Papadia, S., Stevenson, P., Hardingham, N. R., Bading, H., and Hardingham, G. E. (2005). Nuclear Ca²⁺ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J Neurosci* 25, 4279-4287.
- Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y., and Verma, I. M. (2002). Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2140-2145.
- Plaisance, V., Niederhauser, G., Azzouz, F., Lenain, V., Haefliger, J. A., Waeber, G., and Abderrahmani, A. (2005). The repressor element silencing transcription factor (REST)-mediated transcriptional repression requires the inhibition of Sp1. *J Biol Chem* 280, 401-407.
- Porn-Ares, M. I., Samali, A., and Orrenius, S. (1998). Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. *Cell Death Differ* 5, 1028-1033.
- Qiu, S., Hua, Y. L., Yang, F., Chen, Y. Z., and Luo, J. H. (2005). Subunit Assembly of N-Methyl-D-aspartate Receptors Analyzed by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *J Biol Chem* 280, 24923-24930.
- Ralph, G. S., Bienemann, A., Harding, T. C., Hopton, M., Henley, J., and Uney, J. B. (2000). Targeting of tetracycline-regulatable transgene expression specifically to neuronal and glial cell populations using adenoviral vectors. *Neuroreport* 11, 2051-2055.
- Ramesh, N., Kim, S. T., Wei, M. Q., Khalighi, M., and Osborne, W. R. (1996). High-titer bicistronic retroviral vectors employing foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site. *Nucleic Acids Res* 24, 2697-2700.
- Richter, M., Suau, P., and Ponte, I. (2002). Sequence and analysis of the 5' flanking and 5' untranslated regions of the rat N-methyl-D-aspartate receptor 2A gene. *Gene* 295, 135-142.
- Roberts-Lewis, J. M., Savage, M. J., Marcy, V. R., Pinsker, L. R., and Siman, R. (1994). Immunolocalization of calpain I-mediated spectrin degradation to vulnerable neurons in the ischemic gerbil brain. *J Neurosci* 14, 3934-3944.
- Roche, K. W., Standley, S., McCallum, J., Dune Ly, C., Ehlers, M. D., and Wenthold, R. J. (2001). Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat Neurosci* 4, 794-802.
- Rong, Y., Lu, X., Bernard, A., Khrestchatisky, M., and Baudry, M. (2001). Tyrosine phosphorylation of ionotropic glutamate receptors by Fyn or Src differentially modulates

- their susceptibility to calpain and enhances their binding to spectrin and PSD-95. *J Neurochem* 79, 382-390.
- Rubinson, D. A., Dillon, C. P., Kwiatkowski, A. V., Sievers, C., Yang, L., Kopinja, J., Rooney, D. L., Ihrig, M. M., McManus, M. T., Gertler, F. B., *et al.* (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33, 401-406.
- Rumbaugh, G., and Vicini, S. (1999). Distinct synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 19, 10603-10610.
- Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, C., Kushiya, E., Yagi, T., Aizawa, S., Inoue, Y., Sugiyama, H., and *et al.* (1995). Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* 373, 151-155.
- Sala, C., and Sheng, M. (1999). The fyn art of N-methyl-D-aspartate receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 335-337.
- Sans, N., Petralia, R. S., Wang, Y. X., Blahos, J., 2nd, Hell, J. W., and Wenthold, R. J. (2000). A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J Neurosci* 20, 1260-1271.
- Sattler, R., and Tymianski, M. (2000). Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 78, 3-13.
- Scott, B. B., and Lois, C. (2005). Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16443-16447.
- Scott, D. B., Blanpied, T. A., Swanson, G. T., Zhang, C., and Ehlers, M. D. (2001). An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neurosci* 21, 3063-3072.
- Scott, D. B., Michailidis, I., Mu, Y., Logothetis, D., and Ehlers, M. D. (2004). Endocytosis and degradative sorting of NMDA receptors by conserved membrane-proximal signals. *J Neurosci* 24, 7096-7109.
- Schoepp, D., Bockaert, J., and Sladeczek, F. (1990). Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 11, 508-515.
- Sheng, M. (2001). The postsynaptic NMDA-receptor-PSD-95 signaling complex in excitatory synapses of the brain. *J Cell Sci* 114, 1251.
- Sheng, M., and Pak, D. T. (1999). Glutamate receptor anchoring proteins and the molecular organization of excitatory synapses. *Ann N Y Acad Sci* 868, 483-493.
- Siman, R., and Noszek, J. C. (1988). Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron* 1, 279-287.
- Simpkins, K. L., Guttman, R. P., Dong, Y., Chen, Z., Sokol, S., Neumar, R. W., and Lynch, D. R. (2003). Selective activation induced cleavage of the NR2B subunit by calpain. *J Neurosci* 23, 11322-11331.
- Sprengel, R., Suchanek, B., Amico, C., Brusa, R., Burnashev, N., Rozov, A., Hvalby, O., Jensen, V., Paulsen, O., Andersen, P., *et al.* (1998). Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell* 92, 279-289.
- Squier, M. K., Miller, A. C., Malkinson, A. M., and Cohen, J. J. (1994). Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol* 159, 229-237.

- Standley, S., Roche, K. W., McCallum, J., Sans, N., and Wenthold, R. J. (2000). PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 28, 887-898.
- Stephenson, F. A. (2001). Subunit characterization of NMDA receptors. *Curr Drug Targets* 2, 233-239.
- Stricker, N. L., Christopherson, K. S., Yi, B. A., Schatz, P. J., Raab, R. W., Dawes, G., Bassett, D. E., Jr., Bredt, D. S., and Li, M. (1997). PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-terminal peptide sequences. *Nat Biotechnol* 15, 336-342.
- Sucher, N. J., Akbarian, S., Chi, C. L., Leclerc, C. L., Awobuluyi, M., Deitcher, D. L., Wu, M. K., Yuan, J. P., Jones, E. G., and Lipton, S. A. (1995). Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci* 15, 6509-6520.
- Sucher, N. J., Lipton, S. A., and Dreyer, E. B. (1997). Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res* 37, 3483-3493.
- Sugiyama, H., Ito, I., and Hirano, C. (1987). A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature* 325, 531-533.
- Takumi, Y., Matsubara, A., Rinvik, E., and Ottersen, O. P. (1999). The arrangement of glutamate receptors in excitatory synapses. *Ann N Y Acad Sci* 868, 474-482.
- The NINDS t-PA Stroke Study Group (1997). Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. *Stroke* 28, 2109-2118.
- Thiel, G., Greengard, P., and Sudhof, T. C. (1991). Characterization of tissue-specific transcription by the human synapsin I gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3431-3435.
- Tingley, W. G., Roche, K. W., Thompson, A. K., and Huganir, R. L. (1993). Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* 364, 70-73.
- Tovar, K. R., and Westbrook, G. L. (1999). The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci* 19, 4180-4188.
- Tsai, L. H., Delalle, I., Caviness, V. S., Jr., Chae, T., and Harlow, E. (1994). p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371, 419-423.
- Vanderklish, P. W., and Bahr, B. A. (2000). The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states. *Int J Exp Pathol* 81, 323-339.
- Walton, M. R., and Dragunow, I. (2000). Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci* 23, 48-53.
- Wang, K. K. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 23, 20-26.
- Wang, K. K., Posmantur, R., Nath, R., McGinnis, K., Whitton, M., Talanian, R. V., Glantz, S. B., and Morrow, J. S. (1998a). Simultaneous degradation of alphaII- and betaII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J Biol Chem* 273, 22490-22497.
- Wang, Y. F., Tsirka, S. E., Strickland, S., Stieg, P. E., Soriano, S. G., and Lipton, S. A. (1998b). Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med* 4, 228-231.

- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., and Mishina, M. (1993). Distinct spatio-temporal distributions of the NMDA receptor channel subunit mRNAs in the brain. *Ann N Y Acad Sci* 707, 463-466.
- Wechsler, A., and Teichberg, V. I. (1998). Brain spectrin binding to the NMDA receptor is regulated by phosphorylation, calcium and calmodulin. *Embo J* 17, 3931-3939.
- White, S. M., Renda, M., Nam, N. Y., Klimatcheva, E., Zhu, Y., Fisk, J., Halterman, M., Rimel, B. J., Federoff, H., Pandya, S., *et al.* (1999). Lentivirus vectors using human and simian immunodeficiency virus elements. *J Virol* 73, 2832-2840.
- Widdowson, P. S., Gyte, A., Upton, R., Foster, J., Coutts, C. T., and Wyatt, I. (1997). Calpain activation and not oxidative damage mediates L-2-chloropropionic acid-induced cerebellar granule cell necrosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 142, 248-255.
- Williams, K. (1993). Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 44, 851-859.
- Wo, Z. G., and Oswald, R. E. (1995). Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels. *Trends Neurosci* 18, 161-168.
- Wong, L. F., Goodhead, L., Prat, C., Mitrophanous, K. A., Kingsman, S. M., and Mazarakis, N. D. (2006). Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system: therapeutic and research applications. *Hum Gene Ther* 17, 1-9.
- Wu, H. Y., Yuen, E. Y., Lu, Y. F., Matsushita, M., Matsui, H., Yan, Z., and Tomizawa, K. (2005). Regulation of N-Methyl-D-aspartate Receptors by Calpain in Cortical Neurons. *J Biol Chem* 280, 21588-21593.
- Yakovlev, A. G., Knobloch, S. M., Fan, L., Fox, G. B., Goodnight, R., and Faden, A. I. (1997). Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J Neurosci* 17, 7415-7424.
- Young, D., Lawlor, P. A., Leone, P., Dragunow, M., and During, M. J. (1999). Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med* 5, 448-453.
- Zhu, Z., Zheng, T., Lee, C. G., Homer, R. J., and Elias, J. A. (2002). Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. *Semin Cell Dev Biol* 13, 121-128.
- Ziff, E. B. (1997). Enlightening the postsynaptic density. *Neuron* 19, 1163-1174.
- Ziff, E. B. (1999). Recent excitement in the ionotropic glutamate receptor field. *Ann N Y Acad Sci* 868, 465-473.
- Zukin, R. S., and Bennett, M. V. (1995). Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci* 18, 306-313.

Publicaciones